

**Untersuchungen zur Modulation  
der Hitzeschockprotein 70 (Hsp70)-Expression  
und Identifizierung Hsp70-assoziiierter Moleküle  
auf der Zellmembran**

**Dissertation  
zur  
Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)  
der  
Naturwissenschaftlichen Fakultät III -  
Biologie und Vorklinische Medizin der Universität Regensburg**

**vorgelegt von  
Dipl. Biol. Mathias Gehrman  
aus Nabburg**

**Regensburg, im Dezember 2003**

Die Arbeit wurde angeleitet von: Prof. Dr. Gabriele Multhoff

Promotionsgesuch eingereicht am: 16. Dezember 2003

Tag des Kolloquiums: 15. Juni 2004

Prüfungsausschuss:

1. Prüfer: Prof. Dr. E. Holler
2. Prüfer: Prof. Dr. G. Multhoff
3. Prüfer: Prof. Dr. S. Schneuwly

Vorsitz: Prof. Dr. G. Hauska

*Solange wir Krebs und Geisteskrankheiten nicht verstehen, ist unsere Arbeit nicht gemacht.*

James D. Watson

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>8</b>
<b>2</b>	<b>Einleitung</b>	<b>9</b>
<b>2.1</b>	<b>Hitzeschockproteine</b>	<b>9</b>
<b>2.2</b>	<b>Zytoplasmatisches Hsp70</b>	<b>10</b>
2.2.1	Definition	10
2.2.2	Regulation	10
2.2.3	Struktur	12
2.2.4	Funktionen	13
<b>2.3</b>	<b>Membran-gebundenes Hsp70</b>	<b>16</b>
<b>2.4</b>	<b>Hsp70 in der Onkologie</b>	<b>19</b>
2.4.1	Chemotherapie	19
2.4.2	Radiotherapie	20
<b>2.5</b>	<b>Intension und Zielsetzung der Arbeit</b>	<b>21</b>
<b>3</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>22</b>
<b>3.1</b>	<b>Material</b>	<b>22</b>
3.1.1	Chemikalien und Reagenzien	22
3.1.2	Lösungen	23
3.1.3	Puffer	23
3.1.4	Medien	24
3.1.5	Medikamente	24
3.1.6	Kits	25
3.1.7	Antikörper	25
3.1.8	Proteine	28
3.1.9	Zytokine	28
3.1.10	Peptide	28
3.1.11	Molekulargewichtstandards	28
3.1.12	Zelllysate	29
3.1.13	Zellkulturflaschen, Plastikmaterial	29
3.1.14	Zellkulturlinien	29

3.1.15 Primärmaterial	30
3.1.16 Radioaktives Material	31
3.1.17 Sonstige Geräte	31
3.1.18 Sonstiges Material	31
<b>3.2 Methoden</b>	<b>32</b>
3.2.1 Zellen	32
3.2.1.1 Kultur von humanen Zelllinien	32
3.2.1.2 Isolierung von Tumorzellen aus Primärmaterial	33
3.2.1.3 Kryokonservierung von Zellen	34
3.2.1.4 Behandlung von Zellen	35
3.2.1.4.1 Hitzeschock	35
3.2.1.4.2 Antineoplastische Medikamente	35
3.2.1.4.3 $\gamma$ -Bestrahlung	36
3.2.1.5 Mikroskopische Methoden	36
3.2.1.5.1 Durchlichtmikroskopie	36
3.2.1.5.2 Immunfluoreszenzmikroskopie	36
3.2.1.6 Durchflusszytometrie	36
3.2.1.7 Zellzyklusanalyse	37
3.2.1.8 Proliferationsbestimmung	37
3.2.1.9 Aktivierung von Natürlichen Killerzellen	38
3.2.1.10 Zytotoxische Untersuchungen	38
3.2.2 DNA	38
3.2.2.1 Isolierung von DNA aus Zellen	38
3.2.2.2 Agarosegelelektrophorese	39
3.2.3 Proteine	39
3.2.3.1 Zellfraktionierung	39
3.2.3.1.1 Zytoplasma	40
3.2.3.1.2 Zellmembran	40
3.2.3.1.3 Caveolae	41
3.2.3.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	42
3.2.3.3 Coomassie-Färbung	42
3.2.3.4 Silver Staining	42

3.2.3.5 Western blot	42
3.2.3.6 Ponceau-Färbung	43
3.2.4 Sonstiges	43
3.2.4.1 Fotos	43
3.2.4.2 Bildbearbeitung	43
3.2.4.3 Statistik	43
<b>4. Ergebnisse</b>	<b>44</b>
<b>4.1 Hsp70-Membranexpression auf Tumoren und normalen Zellen</b>	<b>44</b>
4.1.1 Vergleich Tumorzelllinien und Normalzellen	44
4.1.2 Vergleich Tumorbiopsiematerial, Knochenmarkproben und Normalgewebe	46
<b>4.2 Effekte antineoplastischer Reagenzien</b>	<b>49</b>
4.2.1 Definition nicht-toxischer Konzentrationen	49
4.2.2 Zytoplasmatische Hsp70-Expression	51
4.2.3 Hsp70-Membranexpression	54
4.2.4 Tubulinaggregate	57
<b>4.3 Effekte einer Bag-4-Transfektion auf die Hsp70-Expression</b>	<b>59</b>
<b>4.4 Effekte von <math>\gamma</math>-Bestrahlung</b>	<b>60</b>
4.4.1 Definition subletaler Dosen	60
4.4.2 Zytoplasmatische Hsp70/Bag-4-Expression	62
4.4.3 Hsp70/Bag-4-Membranexpression	65
<b>4.5 Interaktionspartner von Hsp70 auf der Zellmembran</b>	<b>69</b>
4.5.1 Colokalisierung von Hsp70 und Bag-4	69
4.5.2 Hsp70/Bag-4 in Caveolae	72
<b>4.6 Funktionelle Aspekte von Membran-gebundenem Hsp70 auf Tumorzellen</b>	<b>74</b>
4.6.1 Protektion gegen Bestrahlung	74
4.6.2 $\gamma$ -bestrahlte Tumorzellen als Ziel für Hsp70-aktivierte NK-Zellen	76
<b>5 Diskussion</b>	<b>79</b>
<b>5.1 Hsp70 - ein Tumormarker</b>	<b>79</b>
<b>5.2 Modulation der Hsp70-Expression</b>	<b>80</b>
<b>5.3 Interaktionspartner von Hsp70 auf der Membran</b>	<b>82</b>

5.4	Duale Funktion von Membran-gebundenem Hsp70/Bag-4	85
5.5	Zusammenfassung und Ausblick	87
6	Anhang	88
6.1	Anmerkungen zu den Strukturmodellen der Hsp70-Substratbindedomäne	88
6.2	Danksagung	89
6.3	Erklärung	91
6.4	Literaturverzeichnis	92

# 1 Abkürzungsverzeichnis

7-AAD	7-Aminoactinomycin C
ADP	Adenosin-5'-Diphosphat
AIF	Apoptosis inducing factor
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
Bag	Bcl2 associated athanogene family molecular chaperone regulator
Bcl-2	B cell lymphoma protein 2
Bq	Bequerel
BZM	B-Zell-Medium
C	Cytarabin
CD	Cluster of differentiation
Ktrl	Kontrolle
Da	Dalton
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FCS	Foetal calf serum
FITC	Fluoro-Isothiocyanid
Gy	Gray
HGF	Human growth factor
HRP	Meerrettichperoxidase
HSBP	Heat shock factor binding protein
Hsc	konstitutives Hitzeschockprotein
HSF	Heat shock factor
Hsp	induzierbares Hitzeschockprotein
I	Ifosfamid
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
MFI	Mean fluorescence intensity
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
M	Molar
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
LDH	Laktatdehydrogenase
P	Paclitaxel
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphatpuffer
PDGF	Platelet derived growth factor
PE	Phycoerythrin
PI	Propidiumiodid
PMSF	Phenylmethylsulfoxid
Rab	RAS-related protein
Raf	Rattenfibrosarkom
Ras	Ratten-Sarkom
RNA	Ribonukleinsäure
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SODD	Silencer of death domain
TAP	Transporter associated with presentation
TEMED	Tetramethylethylendiamid
TNF	Tumornekrosefaktor
TNFR	Tumornekrosefaktorrezeptor
TPBS	Tween/PBS
V	Vincristin



## 2 Einleitung

### 2.1 Hitzeschockproteine

Zuerst wurden Hitzeschockproteine (HSPs) in den 60er Jahren von Ritossa beschrieben. Beim Vergleich des Expressionsmuster von Genen in der Speicheldrüse von *Drosophila* stellte er fest, dass nach Hitzeexposition oder Behandlung mit verschiedenen Chemikalien die mRNAs für bestimmte Proteine vermehrt produziert wurden (Ritossa, 1962; Tissieres *et al.*, 1974; Ritossa, 1996). Aufgrund des Merkmals der Induzierbarkeit durch exogene Stressfaktoren wurden diese Proteine als Hitzeschockproteine bezeichnet. Nach exogener oder endogener Stimulation wird ihre Synthese stark induziert, wohingegen die Synthese anderer Proteine reduziert wird. Heute weiß man, dass HSPs in Zellen auch unter physiologischen Bedingungen wichtige Aufgaben bei der Synthese, Faltung und dem Transport von Proteinen übernehmen (Hartl und Hayer-Hartl, 2002; Csermely, 2001).

Die verschiedenen Familien der HSPs sind relativ heterogen mit Proteinen im Größenbereich von ca. 30 kDa bis ca. 110kDa. Sie kommen soweit untersucht in allen Organismen, angefangen von Archaeen und Bakterien bis hin zu Eukaryonten vor (Gunther und Walter, 1994). Entsprechend ihres Molekulargewichts werden Hsps in verschiedene Familien unterteilt: die sogenannten kleinen Hitzeschockproteine (Hsp20), die HSP40-, die HSP60- (oder Chaperonine), die HSP70-, die HSP90- und die HSP110-Familie (Morimoto, 1998; Parsell *et al.*, 1994). Die verschiedenen Familien unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Struktur und Expression stark. Innerhalb der Zelle sind Hsps in unterschiedlichen Kompartimenten vertreten, z.B. im Zytoplasma (z.B. Hsc70) und im Zellkern (z.B. Hsp27), im Endoplasmatischen Reticulum (z.B. Grp78), in Lysosomen (z.B. Hsp70), in den Mitochondrien (z.B. Hsp60, Grp75) und in der äußeren Zellmembran (z.B. Hsp70) (Todryk *et al.*, 2003; Kiang und Tsokos, 1998).

Unter den Familien der Hitzeschockproteine nimmt die HSP70-Familie eine herausragende Stelle ein. Ihre Mitglieder finden sich in nahezu allen Organismen, in allen zellulären Kompartimenten und selbst im extrazellulärem Raum (Feige und Polla, 1994). Die Bedeutung der HSP70-Familie soll im Folgenden kurz beschrieben werden.

## 2.2 Zytoplasmatisches Hsp70

### 2.2.1 Definition

Nachdem sich meine Arbeit speziell mit Mitgliedern der Hsp70-Familie beschäftigt, soll darauf im Folgenden ein besonderer Augenmerk gerichtet werden. Die wichtigsten Vertreter dieser Familie sind das durch Stress induzierbare 72 kDa Hsp70 und das konstitutiv exprimierte Hsc70 mit einem Molekulargewicht von ca. 73 kDa. Beide Proteine sind bezüglich ihrer Aminosäuresequenz zu 85% identisch (Gunther und Walter, 1994). Hsc70 wird in Zellen konstitutiv exprimiert und kann bis zu 1% daller zytoplasmatischen Proteine ausmachen (Feige und Polla, 1994). Es ist nur schwach induzierbar (ca. 3-6-fach). Im Gegensatz dazu wird Hsp70 konstitutiv nur schwach exprimiert, kann aber durch verschiedene Stressstimuli stark induziert werden (~20-fach).

### 2.2.2 Regulation

Für eine effektive Expression von Hsp70 sind vor allem die sogenannten Hitzeschockfaktoren (*heat shock factors*, HSFs) verantwortlich. HSFs sind Transkriptionsfaktoren, die mit sogenannten Hitzeschockelementen in der Promoterregion der DNA interagieren. Von den bisher 4 bekannten humanen HSFs sind die Hitzeschockfaktoren 1 und 2 (HSF1, HSF2) am besten untersucht. HSF1 ist für eine rasche Antwort auf Reize wie Hitze und Chemikalien beschrieben worden (Mathew *et al.*, 2001). Normalerweise liegt HSF1 im Zytoplasma als Monomer vor. Nach Stimulation wird es durch Mitglieder der mitogen-aktivierten Proteinkinasefamilien (*MAP kinases*) hyperphosphoryliert. Nach Trimerisierung kommt es zu einer Translokation des HSF1-Komplexes in den Kern. Durch Bindung des Komplexes an die Promotorregion werden Hitzeschockgene angeschaltet (Jolly *et al.*, 2002). Im Gegensatz zu HSF1, ist die Aktivierung von HSF2 zeitverzögert und weniger effektiv, im Wirkmechanismus jedoch identisch (Mathew *et al.*, 2001). Für den Abbruch der Hsp70-Transkription sind mindestens zwei Prozesse verantwortlich. Der eine erfolgt über einen negativen Rückkopplungsmechanismus durch das Hsp70 Protein selbst. Hsp70 bindet an die Transaktivierungsdomäne von HSF1 und unterbindet so die Transkription seines eigenen Gens (Shi *et al.*, 1998). In einem zweiten Prozess ist HSBP1 (*heat shock factor binding*

*protein 1*) beteiligt, das direkt an trimerisiertes HSF1 und an das Gen *hsp70* bindet und somit die Bindung von HSF1 an die DNA inhibiert (Satyal *et al.*, 1998). In Western blots konnte von unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden (Botzler *et al.*, 1999), dass in Zellen der myelogenen Leukämiezelllinie K562 bereits nach 15min subletaler Hitzebehandlung (41,8°C) die Menge an intrazellulärem Hsp70 sinifikant ansteigt und nach ca. 60min eine Plateauphase auf etwa die dreifache Menge relativ zu unbehandelten Zellen erreicht ist (Abb. 1).

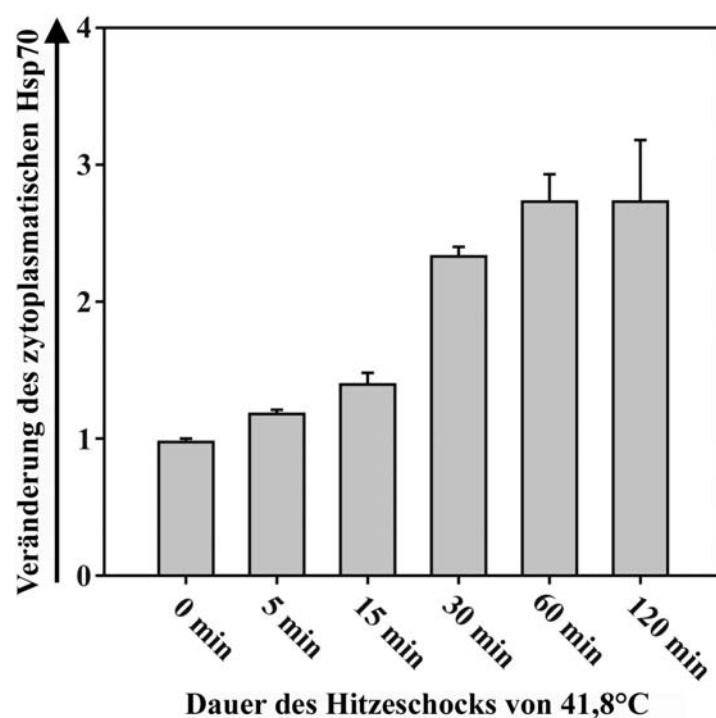


Abb. 1: Anstieg der intrazellulären Hsp70-Menge nach Hitzeschock bei 41,8°C.

Zellen der myelogenen Leukämiezelllinie K562 wurden in einem Wasserbad einer Temperatur von 41,8°C ausgesetzt. Kontrollzellen wurden im Brutschrank bei 37°C belassen. Von den Zellen wurde dann das Zytoplasma gewonnen. Gleiche Mengen an Gesamtprotein (10µg) wurden elektrophoretisch aufgetrennt und auf Nitrozellulosemembranen übertragen. Hsp70 wurde mit einem monoklonalen Antikörper markiert und das Volumen der Banden wurden densitometrisch bestimmt.

Die erhöhte Hsp70 Menge bleibt dann für mindestens 24h erhalten, bevor sie dann wieder das normale Niveau erreicht.

### 2.2.3 Struktur

Das translatierte Hsp70-Protein ist aus 641 Aminosäuren (AS) aufgebaut (SwissProt Acc.No. P08107). Es besteht aus 2 Hauptdomänen (Abb. 1). Im N-terminalen Teil befindet sich die ATPase-Domäne von etwa 44kDa, daran anschließend die Peptid-bindende Domäne und am C-Terminus eine Domäne von etwa 10kDa mit unbekannter Funktion (Kiang und Tsokos, 1998). Die beiden Domänen sind durch eine Protease-sensible Sequenz getrennt (Nollen und Morimoto, 2002).

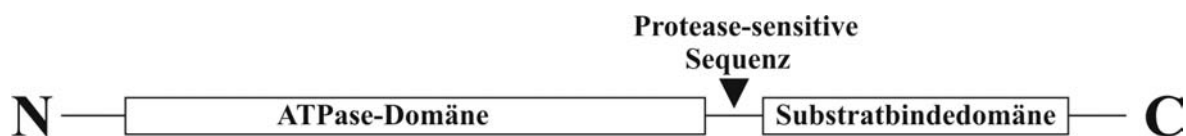


Abb. 2: Struktur von Hsp70.

Das Hsp70 Protein besteht aus 641 Aminosäuren und ist hauptsächlich aus der N-terminalen ATPase-Domäne und der C-terminalen Substratbindedomäne aufgebaut. Etwa in der Mitte der Aminosäuresequenz des Proteins befindet sich eine Protease-sensible Stelle.

Die Fähigkeit von Hsp70 an Proteine zu binden und ihre Struktur zu stabilisieren ist ATP-abhängig. In Abb.3 ist ein vereinfachter Substrat/ATP-Zyklus von Hsp70 skizziert. Ist ATP an Hsp70 gebunden (Hsp70 grün), so ist die Substratbindetasche geöffnet. In diesem Zustand ist Hsp70 in der Lage Substrat (S) mit geringer Affinität zu binden. Die Bindung von Substrat (Schritt 1 in Abb. 3) kann durch das Cochaperone Hsp40 gesteigert werden (Hohfeld *et al.*, 1995; Minami *et al.*, 1996). Durch einen ATP-hydrolysierenden Prozess (Schritt 2) wird die Substrat-bindende Tasche geschlossen und das Substrat bleibt an Hsp70 (rot) gebunden.

Ein Ablösen des Substrats erfolgt wiederum ATP-abhängig. Das Cochaperon GrpE kann diesen Prozess unterstützen (Hohfeld und Jentsch, 1997) (Schritt 3). Nun ist wieder ATP gebunden und Hsp70 ist erneut fähig, Substrat zu binden.

Die Verfügbarkeit von ATP in der Zelle reguliert somit die Substratbindung an Hsp70.

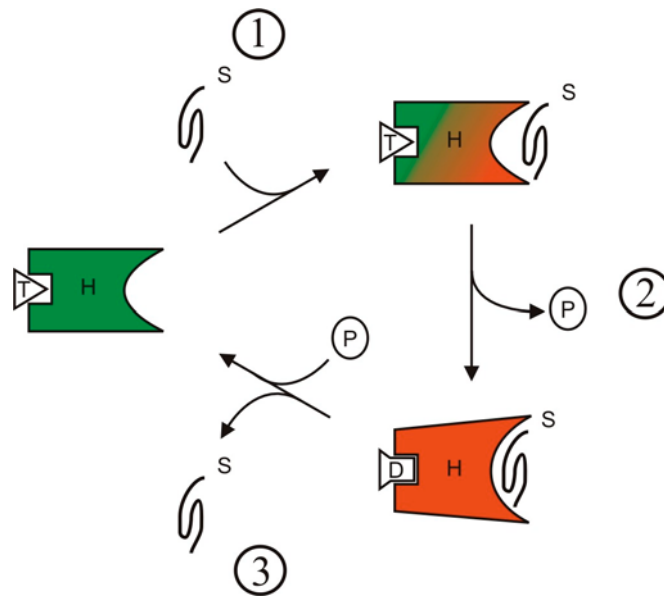


Abb. 3: Vereinfachter ATP- und Substrat-abhängiger Zyklus von Hsp70. Abk.: H Hsp70, D ADP, T ATP, S Substrat, P Phosphat. (Adaptiert aus Hartl und Hayer-Hartl (2002) und Walter und Buchner (2002)).

Nach Stress ist relativ wenig ATP zur freien Verfügung, das heißt mit hoher Wahrscheinlichkeit ist ADP an Hsp70 gebunden, was mit einer hohen Affinität für das jeweilige Substrat verbunden ist. Diese Substratbindefähigkeit und ATPase-Aktivität von Hsp70 sind von einer Vielzahl von Kofaktoren abhängig (Frydman und Hohfeld, 1997; Hohfeld et al., 1995; Hohfeld et al., 2001; Luders et al., 1998).

## 2.2.4 Funktionen

Wie bereits erwähnt, ist Hsp70 gemeinsam mit Cochaperonen für korrekte Proteinfaltung verantwortlich, unterstützt aber auch Protein-Degradation (Mathew *et al.*, 1998). Neben dem assoziierten Hsp40 bestimmen die jeweiligen Partnermoleküle von Hsp70 welcher Weg eingeschlagen wird. Hip (Hsc70- *interacting protein*) und Hop z.B. sind gebunden, wenn es um Proteinfaltung geht, CHIP, wenn es um den Abbau von Proteinen geht (Hartl und Hayer-Hartl, 2002; Hohfeld und Jentsch, 1997; Hohfeld *et al.*, 2001; Meacham *et al.*, 2001). Bei diesen Vorgängen ist noch nicht geklärt welche Rolle dabei Hsc70 im Gegensatz zu Hsp70 zukommt, da beide Moleküle zur Bindung anderer Proteine fähig sind.

Bislang konnte experimentell nicht gezeigt werden, ob Hsp70 aktiv Konformationsänderungen der gebundenen Proteine oder Peptide induziert. Vielmehr scheint es so zu sein, dass Hsp70 als Akzeptor für ungefaltete Proteine oder Peptide agiert und andere Hilfsmoleküle die eigentliche Faltung oder Degradation durchführen (siehe Reviews von Hartl und Hayer-Hartl (2002) und Walter und Buchner (2002)).

Neben den ursprünglich beschriebenen Funktionen von Hsp70 bei der Faltung und Degradation von Proteinen sind die Aufgaben im Zytoplasma vielfältig. Unter anderem ist Hsp70 beschrieben als essentielles Partnermolekül von Proteinen, die in die Mitochondrien transportiert werden (Stuart *et al.*, 1994). Hsp70 bindet an neu translatierte Proteine und begleitet sie an die äußere Membran von Mitochondrien. Es wird angenommen, dass Hsp70 dabei die Degradation dieser im Zytoplasma noch nicht funktionsfähig gefalteten Proteine verhindert. Gelangen die für den Transport in die Mitochondrien bestimmte Proteine zusammen mit Hsp70 an Transporterkomplexe der äußeren Mitochondrienmembran, so wird das transportierte Protein unter Abspaltung des mitochondrialen Signalpeptids ATP-abhängig linearisiert und durch die Membranen des Mitochondrium geschleust. Im Inneren des Mitochondriums wird das linearisierte Moleküle durch das dem zytoplasmatische Hsp70 homologe Grp75 (mtHsp70), das mit einem Molekülkomplex an der inneren Mitochondrienmembran assoziiert ist, in Empfang genommen. Grp75 unterstützt das transportierte Protein bei seiner Faltung und stabilisiert diese (Stuart *et al.*, 1994). Es ist inzwischen gut untersucht, dass viele Transportvorgänge neu-synthetisierter Proteine zu und durch intrazelluläre Membranen auf ähnliche Art stattfinden, z.B. in das ER (Haas, 1994) oder in Lysosomen (Terlecky, 1994).

Darüber hinaus ist Hsp70 ebenfalls an der Regulation des Zellzyklus beteiligt (Helmbrecht *et al.*, 2000). In Mauszellen konnte gezeigt werden, dass erhöhtes Hsp70 zu einer Abnahme von strahleninduzierten Schäden führte. Die Apoptoserate war erniedrigt und der durch die Bestrahlung induzierte Arrest in der G2/M-Phase wurde reduziert (Lee *et al.*, 2001). Tatsächlich ist die regulierte Synthese und der regulierte Abbau von Hsp70 in vielen Stufen des Zellzyklus essentiell (Übersicht bei (Helmbrecht *et al.*, 2000)).

Neben diesen bereits unter physiologischen Bedingungen wichtigen Funktionen sind die Hauptaufgaben vor allem die Unterstützung von Vorgängen, die dem Schutz der Zelle oder der Reparatur von Schädigungen nach Stress dienen. Ein prominentes Beispiel ist die

Fähigkeit von Tumorzellen, durch eine erhöhte Hsp70-Expression einen Schutz vor Apoptose zu induzieren. Die Beteiligung von Hsp70 an apoptotischen Prozessen ist vielfältig und betrifft sowohl AIF (*apoptosis inducing factor*)-unabhängige, als auch – abhängige Prozesse und verschiedene Zeitpunkte innerhalb der apoptotischen Signalwege (Ravagnan *et al.*, 2001; Jaattela *et al.*, 1998; Jaattela, 1999). In der Tumorummunologie ist die anti-apoptotische Wirksamkeit von Hsp70 beschrieben worden (Wei *et al.*, 1995; Gabai *et al.*, 1998; Jaattela, 1999). Apoptotische Prozesse, die entweder durch exogene Faktoren (z.B. Tumornekrosefaktor  $\alpha$ , TNF $\alpha$ ) oder spontane Aggregation von Todesrezeptoren mit einer sogenannten death domain (Tumor Nekrosefaktorrezeptor 1, TNFR1; *Death receptor* 3, DR3) können durch Anwesenheit von Hsc70 oder Hsp70 zusammen mit Mitgliedern der Bcl-2 assoziierten Anthanogenfamilie (Bcl-2 *associated family of chaperone regulators*, BAG-Familie) blockiert werden. Die bisher identifizierten humanen Mitglieder dieser Familie sind Bag-1, -2, -3, -4, -5 und -6. Alle besitzen eine hoch konservierte 45 Aminosäuren lange BAG-Domäne, die aus drei Helix-Bündeln von unterschiedlicher Länge und einem variablen N-Terminus besteht (Takayama *et al.*, 1999). Von vier Bag-Proteinen (Bag-1, -3, -4, -6) ist bekannt, dass sie unter anderem mit Hip um die Bindung mit der ATPase-Domäne von Hsp70 konkurrieren (Hohfeld *et al.*, 1995) und die Chaperon-Aktivität von Hsp70 unterstützen. Auch wird angenommen, dass BAG-Proteine als zelluläre Adaptor-Moleküle agieren, die zusammen mit Hsp70 an die zytoplasmatische Domäne des 55kDa TNFR1 binden (Jiang *et al.*, 1999). Sie verhindern damit die spontane Rezeptortrimerisierung und damit verbundene Aktivierung der *death domain*, was zu einer Weiterleitung apoptotischer Signale über TRADD, FADD, TRAF und RIP führt. Überexpression von Bag-4, auch Silencer of Death Domain (SODD) genannt, inhibiert TNF-induzierte Apoptose (Miki und Eddy, 2002). Andererseits schützt eine Überexpression von Hsp70 vor TNF $\alpha$  induziertem Zelltod in Mäusen (Van Molle *et al.*, 2002). Kürzlich wurden Bag-Proteine als wichtige, den ATPase-Zyklus von Hsp70 kontrollierende Kofaktoren beschrieben (Song *et al.*, 2001; Thress *et al.*, 2001). Die Verfügbarkeit von hydrolyisierbaren ATP reguliert die BAG-Bindung. Außer TNFR1 interagieren Bag-Proteine mit Bcl-2 (Antoku *et al.*, 2001), Raf-Kinase (Song *et al.*, 2001), Androgen- (Briknarova *et al.*, 2001), HGF- und PDGF-Rezeptoren (Bardelli *et al.*, 1996). Nach Stress, wenn die Hsp70-Synthese hochreguliert wird, könnten Bag/Rezeptor-Komplexe durch Bag/Hsp70-Komplexe ersetzt werden. Obwohl die molekulare Basis für

die Interaktion zwischen der ATPase-Domäne von Hsp70 und der kurzen BAG-Domäne von Bag-4 bereits im Detail beschrieben worden ist (Briknarova *et al.*, 2001; Sondermann *et al.*, 2001), ist das Wissen um Stress-induzierte Veränderungen von Proteinen an und in der Membran, dem Initiationspunkt der Apoptose, noch begrenzt.

Zusammenfassend läßt sich feststellen, dass Hsp70 bei essentiellen Vorgängen innerhalb der Zelle, die für das Überleben erforderlich sind, eine wichtige Rolle spielt. Die publizierten Daten zeigen aber auch, dass (i) bei diesen verschiedenen Vorgängen Hsp70 auf die Zusammenarbeit mit anderen Proteinen angewiesen ist, (ii) durch die Interaktionen mit anderen Proteinen auch Hsp70 einer starken Kontrolle unterworfen ist und (iii) durch die jeweiligen Interaktionspartner die Funktion von Hsp70 modifizierbar ist.

## **2.3 Membran-gebundenes Hsp70**

Neben den beschriebenen Funktionen von Hsp70 im Zytoplasma, die der Unterstützung und der Aufrechterhaltung der Zellhomöostase dienen, besitzt Hsp70 aber auch immunstimulatorische Wirkungen, sofern sie in oder auf der Zellmembran lokalisiert sind oder in den extrazellulären Raum freigesetzt wird. Beide Phänomene sollen im weiteren beschrieben werden. Seit längerem ist bekannt, dass Hsp70 eine über MHC Klasse 1 vermittelte CD8 T-Zellantwort induzieren kann. Intrazellulär transportiert Hsp70 immunogene Peptide zusammen mit TAP-Molekülen von den Lysosomen oder vom Proteasom an das ER, wo die Beladung von MHC-Molekülen stattfindet, die diese Peptide an der äußeren Zellmembran dem Immunsystem präsentieren. Je nachdem ob es sich um körpereigene oder fremde Peptide handelt, wird eine Immunantwort initiiert oder unterdrückt. Innovative Immuntherapien setzen Hsp70-Peptidkomplexe, die von Tumoren gewonnen wurden, als Vaccine zur Stimulation von T-Zellen ein. Eine Reihe von Rezeptoren wie z.B. CD91, TLR2/4 konnten auf APC identifiziert werden, die für die Bindung und Aufnahmen von Hsp-Peptid-Komplexen verantwortlich sind (Ishii *et al.*, 1999; Binder *et al.*, 2001; Basu *et al.*, 2000).

Unsere Arbeitsgruppe konnte bereits 1995 eine ungewöhnliche Membranlokalisierung von Hsp70 auf Tumorzellen, aber nicht auf normalen, gesunden Zellen nachweisen (Multhoff *et al.*, 1995b). Die Membranexpression von Hsp70 ist verbunden mit einer verstärkten



Sensitivität gegenüber einer Lyse durch Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) (Botzler *et al.*, 1996; Multhoff *et al.*, 1997; Multhoff *et al.*, 1999).

Anhand eines Mausmodells konnten diese Daten von unserer Arbeitsgruppe *in vivo* bestätigt werden. In immundefizienten Mäusen konnte Tumorwachstum durch TKD-aktivierte NK-Zellen inhibiert werden (Moser *et al.*, 2002). Interessant ist in diesem Zusammenhang, dass sich T-Zellen weder durch Hsp70 ohne gebundenes Peptid noch durch das TKD-Peptid in ihrer Lysekapazität gegenüber Hsp70-positiven Zellen aktivieren lassen. T-Zellen unterscheiden auch nicht bezüglich Hsp70-negativen oder -positiven Tumorzellen (Multhoff *et al.*, 1995a)

Zusätzlich dazu konnte unsere Arbeitsgruppe zeigen, dass sich die Hsp70-Membranexpression von Tumorzellen sowohl durch Hitzeschock, als auch durch membraninteraktive Substanzen (z.B. ET-18-OCH<sub>3</sub>) steigern lässt (Botzler *et al.*, 1999). Zellen mit erhöhter Hsp70-Membranexpression sind dann auch sensibler gegenüber Lyse durch TKD-aktivierte NK-Zellen.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass Membran-gebundenes oder extrazellulär lokalisiertes Hsp70 eine stimulierende Wirkung auf das angeborene Immunsystem besitzt.

Andere Arbeitsgruppen berichten, dass extrazellulär lokalisiertes Hsp70 die Induktion von pro-inflammatorischen Zytokinen durch Antigen-präsentierende Zellen (APC) induzieren kann. Diese Aktivierung erfolgt über Hsp70-spezifische Rezeptoren auf APC. Beschrieben sind unter anderem Toll like receptor 4 (TLR4) (Asea *et al.*, 2002), Lipopolysaccharidrezeptor CD14 (Asea *et al.*, 2000) und der  $\alpha$ 2-Makroglobulinrezeptor CD91 (Basu *et al.*, 2001). Unsere Arbeitsgruppe konnte nachweisen, dass der für NK-Zellen spezifische C-Typ Lektinrezeptor CD94 Hsp70 bindet. CD94-positive NK-Zellen lysieren Hsp70-positive Tumorzellen mit höherer Effizienz als Hsp70-negative Zellen (Gross *et al.*, 2003a). Interessanterweise lassen sich NK-Zellen sowohl durch Hsp70, als auch durch ein 14-mer aus der Substratbindedomäne von Hsp70 aktivieren (Aminosäuresequenz: TKDNNLLKRFELSG; nach den ersten drei Aminosäuren TKD-Peptid genannt). Inkubation von NK-Zellen mit diesem Peptid äußert sich in erhöhter Proliferation der NK-Zellen und in einer gesteigerten lytischen Aktivität gegenüber Hsp70-positiven Zielzellen (Botzler *et al.*, 1998; Multhoff *et al.*, 2001; Multhoff *et al.*, 1999). Eine klinische Studie zur Anwendbarkeit einer TKD-Stimulation von NK-Zellen in der

Krebstherapie wurde bereits durchgeführt. PBMnC von Patienten mit Hsp70-positiven Tumoren wurde durch Leukapharese und anschließender Ficoll-Separation isoliert. Die Zellen wurden dann mit TKD-Peptid und niedrig dosiertem IL-2 stimuliert. Diese autologen aktivierten Zellen wurden dann in den Patienten reinfundiert. Danach wurden regelmäßig Blutproben entnommen um den Immunstatus der NK-Zellen zu überprüfen. Parallel wurden mit Tumorzellen aus dem Patienten *in vitro* Lyseexperimente durchgeführt. Die TKD-aktivierten Zellen lysierten autologe Tumorzellen mit erhöhter Effizienz verglichen mit IL-2 aktivierten Zellen, wie anhand von  $^{51}\text{Chrom}$ -release Assays festgestellt werden konnte. Die aus dieser Phase I-Studie gewonnenen Daten liessen den Schluss zu, dass sich Patienten-PBMnC *ex vivo* stimulieren lassen und dass dieses Verfahren Nebenwirkungs-frei ist (unpublizierte Daten).

Inzwischen sind Strukturmodelle von Hsp70 veröffentlicht worden, nach denen die dem TKD-Peptid homologe, aus 14 Aminosäuren bestehende Sequenz auf der Außenseite der Substratbindedomäne, gegenüber der Substratbindestelle orientiert ist (Abb. 2). Die potentiellen Modelle stammen aus Röntgenstrukturanalysen bzw. aus



Abb. 4: Strukturmodelle der Substratbindedomäne von Hsp70.

Die Modelle zeigt aus der Aminosäuresequenz ermittelte potentielle Strukturmodelle von Hsp70. Im Modell links ist die dem TKD-Peptid homologe Sequenz TKDNNLLGRFELSG farblich markiert, die erste (Threonin, THR) und die letzte (Glycin, Gly) Aminosäure des TKD-Peptides sind rot, die übrigen Aminosäuren türkis hervorgehoben. Rechts oben das gleiche Modell um 90° nach links gedreht verdeutlicht

die Oberflächenlage der aus 14 Aminosäuren bestehenden Sequenz. Rechts unten ein alternatives Modell mit gleicher Orientierung. Die Pfeile bei den Modellen auf der rechten Seite weisen auf die potentielle Substratbindestelle hin. (Modelle links und rechts oben nach der Vorlage 1dkzA.pdb, Modell rechts unten nach der Vorlage 1ckrA.pdb der SWISS-MODEL REPOSITORY (Schwede *et al.*, 2003), siehe dazu auch Anhang 6.1)

Kernmagnetismusresonanzuntersuchungen des C-terminalen Bereichs von Hsp70 (TrEMBL Acc.No.: P08107) (Schwede *et al.*, 2003; Gasteiger *et al.*, 2001; Boeckmann *et al.*, 2003).

## **2.4 Hsp70 in der Onkologie**

### **2.4.1 Chemotherapie**

Die Diskrepanz zwischen Protektion und Immunstimulation durch Hsp70 ist für die Tumorummunologie von entscheidender Bedeutung, wenn es um die Beurteilung von Therapieformen bei der Bekämpfung von Krebs geht. Einerseits sollen mit den verschiedenen Therapieformen die entarteten Zellen bekämpft werden, andererseits besteht die Möglichkeit, dass gerade durch die Wahl der Therapie Hsp70 im Zytoplasma induziert wird und so seine protektive Wirkung entfalten kann.

Hohe Hsp70-Konzentrationen im Zytoplasma tragen zu anti-apoptotischen Mechanismen bei, wie von unterschiedlichen Arbeitsgruppen gezeigt wurde (Wei *et al.*, 1995; Gabai *et al.*, 1998; Jaattela *et al.*, 1998). In Prostata-Karzinomzellen ist eine hohe endogene Hsp70 Konzentration verbunden mit der Resistenz gegenüber Medikamenten (Roigas *et al.*, 1998). So war es im Rahmen meiner Untersuchungen notwendig, Zytostatika-induzierte Modulation der Hsp70 Expression sowohl intrazellulär als auch bezogen auf die Membran zu analysieren. In meiner Arbeit wurden Zytostatika getestet, die in der Therapie von soliden Tumoren und Leukämien eine breite Verwendung finden und die über verschiedene Wirkmechanismen entartete Zellen angreifen. Die verwendeten Zytostatika lassen sich grob in zwei Gruppen einteilen.

Die erste Gruppe bestehend aus Cytarabin, Carboplatin (O'Dwyer *et al.*, 2000), Fludarabin, Ifosfamid und Doxorubicin (de Beer *et al.*, 2001), interagiert mit DNA/RNA oder beeinflusst Replikation oder Reparaturmechanismen. Cytarabin z.B. ist ein Pyrimidin-Antagonist und wird durch Kinasen in Arabinosyl-Cytosintriphosphat umgewandelt. Es ist

sehr effektiv in der S-Phase des Zellzyklus und ist besonders für schnell teilende Zellen schädlich (Grant, 1998). Cytarabin wird vor seinem Einbau in die DNA durch Deoxycytidinkinasen phosphoryliert, was zum Zelltod führt. In der Klinik wird Cytarabin bei der Behandlung von Akuter lymphoblastischer Leukämie (ALL), Non-Hodgkin-Lymphomen (NHL) und Akuter myelogener Leukämie (AML) angewendet.

Ifosfamid wird in der Regel in der Therapie solider Tumore eingesetzt. In der Leber wird Ifosfamid durch Oxidasen in 4-Hydroxyifosfamid umgewandelt, das dann rasch zu alkylierten Mustard abgebaut wird (Botzler *et al.*, 1997; Multhoff *et al.*, 1996; Zalupski und Baker, 1988). Die DNA-alkylierende und -vernetzende Aktivität induziert speziell in stark proliferierenden Zellen Zelltod. Die übrigen Metaboliten bilden Konjugate mit Glutathion. Um die *in vitro*-Effekte zu untersuchen, verwendete ich die aktivierte Form von Ifosfamid, 4-Hydroperoxyifosfamid, das in wässriger Lösung äquivalente Mengen an Wirkstoff lieferte.

Die andere Gruppe der verwendeten Zytostatika, bestehend aus Vincristin und Paclitaxel, beeinflusst das Mikrotubulinetzwerk der Zellen. Vincristin wird entweder in der Einzeltherapie oder in Kombination mit Ifosfamid, Methotrexat oder Cytarabin bei der Behandlung von verschiedenen soliden Tumoren, aber auch von ALL, Akuter nicht-lymphoblastischer Leukämie (ANLL) oder NLL verwendet. Von Vincristin ist bekannt, dass es an Tubulin bindet, die mitotische Spindelbildung unterbindet und so einen Mitose-Stop in der Metaphase verursacht (Gidding *et al.*, 1999). Paclitaxel wird in der Therapie gegen Zervix- und Mammakarzinome verwendet (Eisenhauer und Vermorken, 1998; Blagosklonny und Fojo, 1999). Es wird angenommen, dass Paclitaxel an die Microtubuli bindet und die dynamische Reorganisierung des tubulären Netzwerks in der aktiven Interphase und der Mitose unterbindet. Paclitaxel unterstützt die Bündelung von Mikrotubuli und verhindert ihre Depolymerisierung (Kingston, 2000; Snyder *et al.*, 2001).

### **2.4.2 Radiotherapie**

Ein weiterer physikalischer Therapieansatz gegen eine Vielzahl von Tumoren ist die  $\gamma$ -Bestrahlung. Obgleich eine Reihe von Strahleneffekten bislang ungeklärt sind, wurde ein Einfluss auf die Hsp70 Expression in unterschiedlichen Zellsystemen gezeigt. In tierischen Zellen konnte zytoplasmatisches Hsp70 durch nicht-letale  $\gamma$ - Bestrahlung erhöht werden

(Sierra-Rivera *et al.*, 1993). In menschlichen Fibroblasten konnte die Hsp70-Expression mit energiereichem UV-Licht gesteigert werden (Suzuki und Watanabe, 1992). Überexpression von Hsp70 in Mauszellen führte zu einer Reduzierung der strahleninduzierten Schädigungen, speziell dem Arrest von Zellen in der G2/M-Phase und dem damit verbundenem strahlungsinduzierten Zelltod (Lee *et al.*, 2001).

Nach Bestrahlung werden nahezu alle Komponenten einer Zelle betroffen: die Membranen, Proteine, DNA und nieder-molekulare Substanzen, wie das Wasser durch Radikalbildung. Limitiert ist die verwendete Dosis durch die Beschädigungen der gesunden Zellen im Umfeld (Stone *et al.*, 2003). Zusätzlich kann es durch Bestrahlung zu Tumorenbildung kommen (Travis, 2002). Zur Effizienzsteigerung wird die  $\gamma$ - Bestrahlung oft in Kombination mit Chemotherapie durchgeführt (Bartelink *et al.*, 2002; Hennequin und Favaudon, 2002).

## **2.5 Intension und Zielsetzung der Arbeit**

Intrazellulär fungieren Hitzeschockproteine (Hsp) als molekulare Chaperone und unterstützen Faltung und Transport *de novo* synthetisierter Proteine. Neuere Daten zeigen, dass speziell extrazelluläre oder membranständig lokalisierte Hsp mit einem Molekulargewicht von 70kDa oder auch 90kDa eine wichtige Rolle in der Tumor-Immunantwort spielen. In meiner Doktorarbeit sollte mit Hilfe zellbiologischer, immunologischer und biochemischer Methoden die Zytostatika- oder Radiotherapie-induzierte Modulation von Hsp70 in unterschiedlichen Tumormodellsystemen untersucht werden. Besonderer Augenmerk galt dabei der Identifizierung Hsp70-assoziiierter Moleküle (wie z.B. Bag-4/SODD), die neue Erkenntnisse zum Mechanismus des Transportweges von Hsp70 an die Zellmembran liefern könnten.

Um die klinische Relevanz der *in vitro* generierten Ergebnisse zu untersuchen, sollten Blutproben und primäres Biopsiematerial von Tumorpatienten in ähnlicher Weise untersucht werden.

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 *Material*

##### 3.1.1 Chemikalien und Reagenzien

Chemikalie	Konzentration	Hersteller
2-Propanol	100%	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
2-Propanol	70%	Braun, Melsungen
7-Amino-Actinomycin D (7-AAD)		BD Biosciences, Franklin Lakes, U.S.A.
Acrylamidlösung	30% Acrylamid, 0,8% Bisacryamid, in wässriger Lösung	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Ammoniumpersulfat		BioRad
Bromphenolblau		Sigma
Calciumdichlorid		Merck
Dinatriumhydrogenphosphat		Merck
DMSO		Sigma
DTT		Sigma
Essigäure	100%	Merck
Ethanol	99,6%	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Ethidiumbromid		Sigma
G418		PAA
Glycerin		Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Glycin		Carl Roth GmbH, Karlsruhe
HEPES	1 M	Gibco BRL
3H-Thymidin		Hartmann Analytics
Kaliumchlorid		Merck
Kaliumhydrogenphosphat		Merck
Magnesiumchlorid		Sigma
Methanol		Merck
Microscint <sup>TM</sup> 20		Packard Bioscience Company
Natriumacetat		Merck
Natriumazid		Amersham Biosciences UK Limited, Little Chalfont, U.K.
Natriumcarbonat		Sigma
Natriumchlorid		Merck
Natriumzyanoborohydrid		Pierce
Natriumdihydrogenphosphat		Sigma
Natriumhydrogencarbonat		Merck
Natriumhydrogenphosphat		Sigma
Natriumlaurylphosphat		BioRad
Nonidet P-40 (NP-40)		Sigma
Paraformaldehyd		Sigma

Phenylmethylsulfoxid (PMSF)		Sigma
Propidiumiodid		Calbiochem
Protease Inhibitor Cocktail		Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Saccharose		Merck
Salzsäure	32%	Merck
Tetramethylethyldiamin (TEMED)		BioRad
Tris		BioRad
Triton-X 100		Sigma
Trypanblau		Sigma
Tween 20		Merck
Wasserstoffperoxid		Carl Roth GmbH, Karlsruhe

### 3.1.2 Lösungen

Bezeichnung	Konzentration	Hersteller
Foetales Kälberserum (FCS)	-	Gibco/BRL
L-Glutamin	200mM	Gibco/BRL
Penicillin/Streptomycin (PenStrep-Lösung)	10.000U/ml PenNa 10.000µg/ml Streptsulfate	Gibco/BRL
Natriumpyruvat	100mM	Gibco/BRL
Coomassie-Blau	-	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Ponceau-S Lösung	-	Sigma
Protease-Inhibitor-Cocktail (complete, Mini, EDTA-free)	1 Tablette auf 10ml dd	zur Vermeidung enzymatischen Verdaus von Proteinen
PMSF-Lösung	50mM in EtOH	zur Vermeidung enzymatischen Verdaus von Proteinen
RPMI1640	-	Gibco/BRL
Trypsin/EDTA	0,05% Trypsin 0,02% EDTA in PBS	Gibco/BRL
Trypanblaulösung	0,4%	Gibco/BRL

### 3.1.3 Puffer

Bezeichnung	Zusammensetzung	Lösungsmittel	Verwendung
Phosphat Buffered Saline (PBS)	gem. Hersteller	-	Standardpuffer mit physiologischem Salzgehalt
Ficoll	gem. Hersteller	-	Lymphozytenseparationsmedium
Zelllysepuffer	1% NP-40, 1mM PMSF	PBS	Zur Gewinnung von Zytoplasmapräparationen
Dounce-Puffer		dd	hypotonischer Puffer zur

			Gewinnung von Plasmamembranen
Tonizitätswiederherstellungspuffer		dd	Zur Herstellung einer physiologischen Salzkonzentration nach Aufbrechen von Zellen um die Zerstörung von Zellkernen zu vermeiden
Lysepuffer von Plasmamembranen	1% Triton-X 100		Lyse von Membranpellets nach Ultrazentrifugation
Waschpuffer für Nitrozellulose-Membranen (TPBS)	0,5% Tween 20	PBS	Abwaschen von ungebundenem Antikörper
Blockierungspuffer	5% Trockenmilchpuffer	TPBS	Blockierungspuffer bei Western blots, um die unspezifische Bindung von Antikörpern zu verhindern
TNE-Puffer	NaCl 150mM, EDTA 50mM, TrisCl 50mM, pH 7,5	dd	Puffer zur Gewinnung von Caveolae
TNX-Puffer	TNE-Puffer mit 1% Triton-X 100	-	Lyse von Plasmamembranpellets zur Raftgewinnung
Phosphatpuffer		dd	
DNA Lösepuffer	100mM TrisHCl pH 7,5 100mM EDTA	dd	Puffer zur Lyse von Zellen bei der Isolierung von DNA
DNA Lysepuffer	100mM TrisHCl pH 8,5 500mM EDTA 10% SDS 5M NaCl 20mg/ml Proteinase K	dd	Puffer zur Suspendierung von DNA und Beseitigung von DNA-bindenden Proteinen

### 3.1.4 Medien

Bezeichnung	Zusammensetzung	Lösungsmittel
B-Zell-Medium (BZM)	10% FCS, 1% PenStrep-Lösung, 1% L-Glutamin-Lösung, 1% Natriumpyruvat-Lösung	RPMI1640
T-Zell-Medium	wie BZM mit Zusatz von 2IU/ml IL-2	RPMI1640
Einfriermedium	20% DMSO	RPMI1640

### 3.1.5 Medikamente

Wirkstoff	Präparat	Hersteller	Bemerkungen
-----------	----------	------------	-------------



Carboplatin	Carboplat	Bristol-Myers Squibb GmbH, München	-
Cytarabin	Ara-cell	cellpharm. Hannover	-
Doxorubicin	Doxo-Cell	cellpharm, Hannover	-
Fludarabin	Fludara	Medac, Wedel	-
Ifosfamide	-	-	Verwendet wurde die aktive Form 4-Hydroperoxyifosfamid in frisch zubereiteter wässriger Lösung
Paclitaxel	Taxol	Bristol-Myers Squibb GmbH, München	-
Vincristinsulfat	Vincristin Liquid, Lilly	Bristol-Myers Squibb GmbH, München	-

### 3.1.6 Kits

Für den Nachweis von Proteinen auf Nitrocellulosemembranen nach Western Blots wurde das ECL Western Blotting Detection Kit von Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München verwendet.

### 3.1.7 Antikörper

Bezeichnung (Klon)	Ursprung	Isotyp	Konjugat	Firma	Verwendung
Primärantikörper					
Aktin	Maus	IgM	-	Oncogene, Boston, U.S.A.	IHC, WB
AS02	Maus	IgG1	FITC	Dianova, Hamburg	FACS
Bag-1 (C-16)	Ziege	IgG	-	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, U.S.A.	FACS, WB
Bag-1 (FL-274)	Kaninchen	IgG1	-	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, U.S.A.	FACS, WB
Bag-1 (N-20)	Kaninchen	IgG	-	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, U.S.A.	FACS, WB
Caveolin-1	Kaninchen	IgG	-	Upstate, Biotechnology, LakePlacid, U.S.A.	WB

CD3/CD16 + CD56	Maus	IgG1 IgG2a	FITC PE	BD Biosciences, Franklin Lakes, U.S.A.	FACS
DR3	Maus	IgG2a	-	Dianova, Hamburg	FACS
Hsp60 (SPA 806)	Maus	IgG1	-	Stressgen, Victoria, Canada	IHC, IP
Hsp70 (cmHsp70.1)	Maus	IgG1	FITC	multimmune GmbH, Regensburg	FACS, ICH, BL
Hsp70 (cmHsp70.2)	Maus	IgG1	-	multimmune GmbH, Regensburg	IHC, IP, BL
Hsp70 (SPA 810)	Maus	IgG1	-	Stressgen, Victoria, Canada	ICH, IP, WB
Hsp70 (7F4)	Ratte	IgG	-	Erhalten von Dr. Kremmer, GSF, München	FACS, WB
Human HLA Class 1, CBL 139F	Maus	IgG2a	FITC	Cymbus Biotechnology,	FACS
Isotypenkontrolle	Maus	IgG1	FITC	BD Biosciences, Franklin Lakes, U.S.A.	FACS, IHC
Isotypenkontrolle	Maus	IgG2a	FITC	BD Biosciences, Franklin Lakes, U.S.A.	FACS
Isotypenkontrolle	Maus	IgG2b	FITC	BD Biosciences, Franklin Lakes, U.S.A.	FACS
Isotypenkontrolle	Maus	IgG1	PE	BD Biosciences, Franklin Lakes, U.S.A.	FACS
Isotypenkontrolle	Kaninchen	IgG	-	Southern Biotechnology, Birmingham, U.S.A.	FACS, IHC
Lactatdehydroge nase (LDH)	Goat	-	-	Rockland, Gilbertsville, U.S.A.	WB
MEL-1	Maus	IgG3	-	Signet Pathology Systems, Dedham, U.S.A.	FACS
MEL-2	Maus	IgG2a	-	Signet Pathology Systems, Dedham, U.S.A.	FACS
MEL-3	Maus	IgG1	-	Signet Pathology Systems, Dedham, U.S.A.	FACS

MEL-4	Maus	IgG2a	-	Signet Pathology Systems, Dedham, U.S.A.	FACS
MEL-5	Maus	IgG2a	-	Signet Pathology Systems, Dedham, U.S.A.	FACS
MHC1 (W6/32)	Maus	IgG2b	-		IHC
P-Glycoprotein (mdr-1 gene product)	Maus	IgG2a	-	Immunotech, Marseille, Frankreich	FACS, WB
Rab 4 (D-20)	Kaninchen	IgG	-	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, U.S.A.	WB
Rab 7 (H-50)	Kaninchen	IgG	-	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, U.S.A.	WB
Rab 9 (C-18)	Ziege	IgG	-	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, U.S.A.	WB
Rab 11 (C19)	Ziege	IgG	-	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, U.S.A.	WB
Silencer of Death Domain, SODD (IMG-152)	Kaninchen	IgG	-	Imgenex, San Diego, U.S.A.	FACS, WB
SODD (H-300)	Kaninchen	IgG	-	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, U.S.A.	FACS, IHC, WB, BL
SODD (N-19)	Ziege	IgG	-	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, U.S.A.	FACS, IHC, WB, BL
TNFR1 (H398)	Maus	IgG2a	-	Abcam Limited, Cambridge, U.K.	FACS, WB
TNFR1 (MR1-2)	Maus	IgG1	-	Abcam Limited, Cambridge, U.K.	FACS, WB
TNFR1, CD120a	Maus	IgG1	-	Dianova, Hamburg	FACS
Tubulin	Maus	IgG1 $\kappa$	-	Oncogene, San Diego, U.S.A.	WB, IHC
Sekundärantikörper					
Anti-Kaninchen	Ziege		FITC	DAKO	FACS, WB
Anti-Kaninchen	Ziege		R-PE	DAKO	FACS, WB
Anti-Kaninchen	Ziege		Cy <sup>TM</sup> 3	Dianova, Hamburg	FACS
Anti-Maus	Ziege		FITC	DAKO	FACS
Anti-Maus	Kaninchen	IgG + IgM (H+L)	PE		FACS, IHC
Anti-Mensch	Ratte		HRP	DAKO	WB

Anti-Maus	Kaninchen	IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgA, IgM	HRP	DAKO	WB
Anti-Mensch	Maus		HRP	DAKO	WB
Anti-Mensch	Ziege		HRP	DAKO	WB

Abk.: FACS Fluorescence-activated cell sorting, IHC Immunhistochemie, IP Immunpräzipitation, WB Western blot, BL Blockierung bei <sup>51</sup>Chrom-Assays.

### 3.1.8 Proteine

Bezeichnung	Ursprung	Molekulargewicht	Firma
Hsp70 (NSP-555)	E. coli, rekombinant	72kDa	Stressgen, Victoria, Canada
Hsc70 (NSP-751)	E. coli, rekombinant	73kDa	Stressgen, Victoria, Canada
Hsp60 (NSP-540)	E.coli, rekombinant	60kDa	Stressgen, Victoria, Canada
Annexin-V-FLUOS	E. coli	-	Roche, Mannheim

### 3.1.9 Zytokine

Bezeichnung	Ursprung	Firma
IL-2	rekombinant	Chiron, Ratingen

### 3.1.10 Peptide

Bezeichnung	Sequenz	Nr. AS-Sequenz von Hsp70	Hersteller
TKD	TKDNNLLGRFELSG	450 – 462	Bachem, Bubendorf, Schweiz

### 3.1.11 Molekulargewichtstandards

Als Größenmarker für Western Blot Analysen wurde entweder der Full-Range Rainbow™ Molecular Weight Markers (10 Banden von 15kDa bis 250kDa) von Amersham Biosciences UK Limited (Little Chalfont, U.K.) oder der BOA Protein Marker, Biomol

Feinchemikalien GmbH, Hamburg (11 Banden von 20kDa bis 120kDa in 10kDa-Schritten) verwendet.

### 3.1.12 Zelllysate

Als Positivkontrolle für Western Blot Analysen wurden als Kontrollen entweder das Lysat von EGF-stimulierten A431 Zellen (Upstate, Lake Placid, U.S.A.) oder selbst hergestelltes Lysat von K562-Zellen oder von untransfizierten oder transfizierten HeLa-Zellen verwendet.

### 3.1.13 Zellkulturflaschen, Plastikmaterial

Einwegpipetten (2ml, 5ml, 10ml, 25ml, 50ml)	Corning B.V. Life Sciences, Schiphol-Rijk, Niederlande
Pipettenspitzen	Eppendorf AG, Hamburg
FACS Röhrchen, unsteril	Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, U.S.A.
Reaktionsgefäße (1,5ml oder 2ml)	Eppendorf AG, Hamburg
Zellkulturflaschen, belüftet (25cm <sup>2</sup> , 75cm <sup>2</sup> , 162cm <sup>2</sup> Grundfläche)	Corning B.V. Life Sciences, Schiphol-Rijk, Niederlande
96well Platten	Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, U.S.A.
24well Platte, 12well Platten	Corning B.V. Life Sciences, Schiphol-Rijk, Niederlande
<sup>3</sup> H-Thymidin Inkubationsplatten	PerkinElmer Life Sciences, Boston, U.S.A.

### 3.1.14 Zellkulturlinien

Bezeichnung	Ursprung	Bemerkungen
CX2	Kolonkarzinom	TZB 61005, Tumorbank DKFZ Heidelberg
CX+	Kolonkarzinom	Hsp70-stark exprimierende Subzelllinie von CX2
CX-	Kolonkarzinom	Hsp70-schwach exprimierende Subzelllinie von CX2
Colo357	Pankreaskarzinom	ECACC 94072245, CAMR, Salisbury, U.K. (Lit.: Morgan <i>et al.</i> (1980))
Colo+	Pankreaskarzinom	Hsp70-stark exprimierende Subzelllinie von

		Colo357
Colo-	Pankreaskarzinom	Hsp70-schwach exprimierende Subzelllinie von Colo357
K562	Myelogene Leukämie	ACC 10, DSMZ Braunschweig (Lit.: Lozzio und Lozzio (1975))
HeLa	Zervixkarzinom	ACC 57, DSMZ Braunschweig (Lit.: (SCHERER <i>et al.</i> (1953))
HeLa HS6	Zervixkarzinom	transfiziert mit mouse Bag-4, Mediumzusatz: 30µg/ml G418 (Geschenk von H. Eichholtz-Wirth, GSF, München)
HeLa HS13	Zervixkarzinom	transfiziert mit mouse Bag-4, Mediumzusatz: 30µg/ml G418 (Geschenk von H. Eichholtz-Wirth, GSF, München)
HeLa neo	Zervixkarzinom	transfiziert mit Neo-Vektor ohne Insert, Mediumzusatz: 30µg/ml G418 (Geschenk von H. Eichholtz-Wirth, GSF, München)

### 3.1.15 Primärmaterial

Weiterhin wurden primäre Zellen verwendet:

Zelltyp	Ursprung	Gewinnung, Kultivierung
PBL	gesunde Spender	Ficoll, Kultivierung mit IL-2
NK-Zellen	gesunder Spender	aus Buffy Coats, Aufreinigung nach CD94, Kultivierung mit IL-2, Stimulation mit TKD
Melanom-zelllinien	Patienten mit Melanomen	Zellen wurden gewonnen aus Patientenmaterial des Universitätsklinikums Regensburg und der Hautklinik des Universitätsklinikums in Pécs (Ungarn) und in Kultur genommen

Weiterhin wurden Einzelzellsuspensionen aus Biopsien von Patienten folgenden Tumorerkrankungen untersucht: Mammakarzinome, Gynäkologische Tumoren, Urogenitaltumoren, Tumoren von Lunge und Mediastinum, Tumoren des Gastrointestinaltraktes, Tumoren des HNO-Bereichs, Tumoren endokriner Organe, Knochen- und Weichteilsarkome, Hauttumore, Tumoren des zentralen Nervensystems, sowie verschiedene Akute und Chronische Leukämien.

An der Probenasservierung beteiligt waren neben dem Universitätsklinikum Regensburg das Krankenhaus der Barmherziger Brüder in Regensburg, das Klinikum Großhadern in München, die Klinik in Fulda, die Uni-Klinik Weimar, das Krankenhaus Kronach und die Lungenklinik Hemer. Die Genehmigungen zur Entnahme der Proben von Patienten wurden von den lokalen Ethikkommissionen der teilnehmenden Universitäten erteilt.

### **3.1.16 Radioaktives Material**

Mit  $^3\text{H}$  markiertes Thymidin und  $^{51}\text{Chrom}$  wurde über Hartmann Analytics (Krefeld) bezogen.

### **3.1.17 Sonstige Geräte**

Die Sterilbänke (Clean Air, Hilden), die Brutschränke, verschiedene Tischzentrifugen (beides von Heraeus, Hanau) wurden regelmäßig sterilisiert und gewartet. SDS-PAGE und Western blotting wurde in Gelelektrophoresekammern und Blotting Apparaturen von Hoefer (Amersham, Little Chalfont, U.K.) durchgeführt. Der Szintillationszähler zum Messen von Radioaktivität bei  $^3\text{H}$ -Proliferations-Assays und  $^{51}\text{Chrom}$ -Zytotox-Assays war von Perkin Elmer Life Sciences (Boston, U.S.A.).

### **3.1.18 Sonstiges Material**

Alles sonstige Material und nicht erwähnte Geräte wurden über entsprechende Firmen wie Carl Roth GmbH (Karlruhe) oder Laborcenter bezogen und waren für wissenschaftliche Zwecke, bzw. als für die Zellkultur geeignet ausgewiesen. Sonstige Chemikalien waren von Sigma-Aldrich (München), Roche (Mannheim) oder VWR (Darmstadt).

## **3.2 Methoden**

### **3.2.1 Zellen**

#### **3.2.1.1 Kultur von humanen Zelllinien**

Die Zelllinien wurden unter Standardbedingungen bei 37°C, 95% Luftfeuchtigkeit und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. Die Zellen wuchsen in RPMI1640 unter Zusatz von Penicillin (100U/ml), Streptavidin (100µg/ml), Glutamin (2mM) und 5% oder 10% FCS. Die Zellen wurden 2-3 mal pro Woche passagiert und mit 100.000 Zellen/ml ausgesät. Zellen in Suspension wurden durch Verdünnen passagiert. Adhärente Zellen wurden mit PBS gewaschen, 1 min mit Trypsin/EDTA bei 37°C inkubiert, gezählt und dann in frischen Kulturmedium aufgenommen. Colo357, Colo+, Colo- und Melanomzellen wurden zur Passage zusätzlich mit einem Zellschaber behandelt und dann in Kulturmedium aufgenommen.

Für Versuche wurden Zellen unter oben angegebenen Bedingungen kultiviert, so dass sie sich zum Zeitpunkt der Experimente in der exponentiellen Wachstumsphase befanden. Die Zellkulturen wurden regelmäßig passagiert, auf Vitalität und auf Mycoplasma-Kontamination überprüft. Weiterhin wurden die Zellen routinemäßig auf die Expression von bekannten Oberflächenmarkern untersucht. Von den transfizierten HeLa-Zellen wurden zusätzlich regelmäßig Zelllysate hergestellt, die dann auf Expression der transfizierten Gene untersucht wurden. Nur Zellen mit adäquater Proteinexpression wurden in den Versuchen verwendet.

Von geernteten Zellen wurden 50µl Zellsuspension entnommen und mit 50µl Trypanblaulösung gemischt. Ein Aliquot der Suspension wurde nun in einer Neubauer-Zählkammer gebracht und die Zellen wurden unter Phasenkontrast gezählt. Bei toten und nekrotischen Zellen war die Integrität der äußeren Zellmembran nicht mehr gewährleistet und Trypanblau diffundiert in das Zellinnere. Vitale Zellen mit intakter äußerer Zellmembran nahmen Trypan nicht auf und erschienen im Lichtmikroskop weiss. Bei etablierten Zelllinien lag der Anteil der vitalen Zellen bei regelmäßigem Passagieren über 95%. Bei primären Zellkulturen wurden niedrigere Werte beobachtet. Die Berechnung der Zellzahl erfolgte nach der Formel:  $\text{Zellen/1ml} = n \times 10.000 \times v / q$ , wobei n die Anzahl der gezählten Zellen in q Quadranten ist. Der Faktor v steht für den Verdünnungsfaktor, der aufgrund der 1:1 Mischung mit Trypanblau in der Regel 2 war.



Bei verschiedenen Experimenten war die Bestimmung von Apoptose erforderlich. Zellen in frühen apoptotischen Phasen haben noch eine intakte äußere Zellmembran und nehmen noch kein Trypanblau auf. Bei diesen Versuchen wurden die Zellen nach dem Ernten 10 min mit Annexin-V inkubiert, das mit FITC konjugiert war. Diesen Zellen wurden zusätzlich mit PI inkubiert und dann im FACS analysiert. Anhand der Fluoreszenzintensitäten konnten dann apoptotische und nekrotische Zellpopulationen unterschieden werden. Apoptotische Zellen sind FITC-positiv, nekrotische und spät-apoptotische Zellen sind PI-positiv. Für Positivkontrollen wurden Zellen entweder mit Camptothecin behandelt, mit Zytostatika inkubiert oder mit letalen Dosen radioaktiv bestrahlt.

### **3.2.1.2 Isolierung von Tumorzellen aus Primärmaterial**

Für die Untersuchung von Tumorzellen aus Primärmaterial wurden Gewebeproben aus Biopsiematerial und Blutproben von Patienten und gesunden Spendern aufgearbeitet und analysiert. Teilweise wurde das Material für weitere Untersuchungen in Kultur genommen.

Gewebe aus soliden Tumoren wurde mit PBS gewaschen und dann manuell mit einem Skalpell in möglichst kleine Teile zerschnitten. Das resultierende Zellgemisch wurde mit einer Pipette in Medium suspendiert und anschließend über ein Sieb mit 70µm Maschenweite von gröberen Bestandteilen befreit. Die Zellen wurden dann auf Vitalität gezählt und weiter untersucht.

Blutproben von gesunden Spendern oder Patienten mit hämatologischen Krankheiten wurden mit Hilfe einer Dichtegradientenzentrifugation von Plasma und sonstigen Bestandteilen befreit. Dazu wurde die Blutprobe im Verhältnis 1:1 mit PBS gemischt und in ein 50ml Falconröhrchen vorgelegt. Diese Suspension wurde dann mit 20ml Lymphozytenseparationsmedium (Ficoll, PAA) unterschichtet. Die Röhrchen wurden dann bei 800g zentrifugiert. Nach Abschluß der Zentrifugation befanden sich die Thrombozyten und das Plasma im Überstand, die Erythrozyten im Pellet. Die mononukleären Zellen, die sich in einem Ring in der Interphase zwischen Ficoll und PBS ansammeln, wurden vorsichtig entnommen. Die Zellen wurden dann mit PBS gewaschen, pelletiert und anschließend in Kulturmedium aufgenommen. Dadurch erhält man die Fraktion der Peripheren Mononukleären Zellen (*Peripheral Blood Mononuclear Cells*, PBMC).

Innerhalb einer 1-stündigen Inkubationsphase werden die Monozyten adhärent und die nicht-adhärenenten Lymphozyten können mit dem Überstand abgenommen werden. Dadurch erhält man die Fraktion der Peripheren Blutlymphozyten (*Peripheral Blood Lymphocytes*, PBL). Die PBL wurden nach einem weiteren Waschschrift mit PBS in IL-2-haltigem BZM in Kultur genommen.

### **3.2.1.3 Kryokonservierung von Zellen**

Zellen, die für weitere Versuche gelagert werden sollten, wurden eingefroren. Dazu wurden die suspendierten Zellen mit kaltem PBS gewaschen und mit FCS wieder resuspendiert. Die Suspension wurde mit dem gleichen Volumen an eiskaltem Einfriermedium gemischt und in 2ml Kryoröhrchen gebracht. Der ganze Vorgang muß relativ zügig gehen und bei allen Arbeitsschritten durfte die Temperatur des Mediums nicht über 4°C steigen, da oberhalb dieser Temperatur das dem Einfriermedium zugesetzte DMSO für die Zellen toxisch ist. Die Röhrchen wurden dann in im Kühlschrank vorgekühlte Einfrierboxen gestellt und in eine –80°C Gefriertruhe gestellt. Die Einfrierboxen sind mit Isopropanol gefüllt und gewährleisten eine Abkühlung der Zellen von ca. 1°C/ml pro Minute. Dieses Vorgehen gestattet es, die Zellen bei hoher Überlebensrate einzufrieren. Für langfristige Lagerung wurden die Vials mit den Zellen dann in Gefriertruhen mit flüssigem Stickstoff eingelagert.

Im Gegensatz zum Einfrieren von Zellen soll der Auftauvorgang relativ schnell gehen. Nur ein schnelles Auftauen gewährleistet eine hohe Vitalitätsrate. Dabei mußte wieder darauf geachtet werden, dass oberhalb von 4°C DMSO toxisch ist. Nach dem Auftauen unter fließendem Wasser wurden die Zellen bei niedrigen Drehzahlen bei 4°C abzentrifugiert, einmal mit FCS gewaschen und dann mit Zellkulturmedium in Zellkulturflaschen überführt. Vor Versuchen wurden die Zellen mindestens einmal passagiert und auf intakte Oberflächenexpression relevanter Marker untersucht. Bei Bag-4 transfizierten Zellen wurde zusätzlich eine Zytoplasmapräparation durchgeführt und das Zytoplasma wurde auf erhöhte Bag-4-Menge untersucht.

### 3.2.1.4 Behandlung von Zellen

In Experimenten wurden Zellen auf verschiedene Weisen behandelt um die Unterschiede in der Hsp70-Membranexpression im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen zu untersuchen. Bei allen Methoden wurden zunächst zeit- und konzentrations- bzw. intensitätsabhängige Vitalitätstest durchgeführt um subletale Dosen festzustellen. Mit diesen subletalen Dosen wurden dann Experimente durchgeführt.

#### 3.2.1.4.1 *Hitzeschock*

Suspensionszellen wurden in 15 oder 50ml Falconröhrchen gebracht und diese wurden mit Parafilm umwickelt. Adhärenz Zellen wurden 24h in T25 Zellkulturflaschen kultiviert, um ihre Adhärenz zu gewährleisten. Dann wurden die Zellen für 2h in einem Wasserbad bei einer Temperatur von 41,8°C inkubiert. Kontrollzellen wurden unter gleichen Bedingungen in einem Brutschrank bei 37°C inkubiert. Bei beiden Proben war gewährleistet, dass kein Gasaustausch stattfinden konnte. Die Temperatur von 41,8°C hat sich als nicht-letale Temperatur, bei gleichzeitig optimaler Hsp70-Expression, herausgestellt (Betzler *et al.*, 1999).

Nach der Inkubationsphase wurden die Zellen gewaschen und in frischem Zellkulturmedium aufgenommen. Nach einer 24h-stündigen Erholungsphase im Brutschrank bei 37°C wurden die Zellen für Versuche verwendet.

#### 3.2.1.4.2 *Antineoplastische Medikamente*

Zellen in exponentieller Wachstumsphase wurden zeit- und konzentrationsabhängig mit verschiedenen Zytostatika inkubiert, mit PBS gewaschen und 16h zur Erholung im Brutschrank inkubiert. Dann wurden mit diesen Zellen Experimente durchgeführt. Kontrollzellen wurden mit Medium inkubiert und ansonsten gleich behandelt. Mit Ausnahme von Ifosfamid lagen alle Reagenzien in ihrer aktiven Form vor. Die Reagenzien wurden von der Apotheke des Universitätsklinikums Regensburg bezogen und frisch mit Medium verdünnt für die Experimente verwendet. Ifosfamid liegt nicht in aktiver Form vor. Die verwendete Vorstufe 4-Hydroperoxyifosfamid wandelt sich in wässriger Lösung

spontan in pharmakologisch äquivalente Mengen von 4-Hydroxyifosfamid um, das in die Zelle eindringen kann und dessen Metaboliten dann ihre anti-neoplastische Wirkung entfalten.

#### **3.2.1.4.3 $\gamma$ -Bestrahlung**

Zellen in exponentieller Wachstumsphase wurden mittels einer  $^{137}\text{Cs}$  Strahlungsquelle mit einer Dosisrate von 1Gy/10sek. an Tag 2 nach Zellpassage bestrahlt. Diese Bestrahlung erfolgte entweder fraktioniert (2 x 2Gy – 5 x 2Gy) oder mit Einzeldosen von 1 x 10Gy oder 1 x 20Gy.

### **3.2.1.5 Mikroskopische Methoden**

#### **3.2.1.5.1 *Durchlichtmikroskopie***

Zellen wurden in einem Zeiss Axiovert 25 Mikroskop bei 10-facher oder 40-facher Vergrößerung analysiert und mit einer Fuji FinePix S1 Pro Kamera fotografiert. Zellen die parallel auf Immunfluoreszenz untersucht wurden, wurden mit einer Zeiss Axioscop 25 Scanning Mikroskop fotografiert.

#### **3.2.1.5.2 *Immunfluoreszenzmikroskopie***

Zellen wurden wie unter Durchflusszytometrie beschrieben mit Antikörpern inkubiert und mit DAKO Fluoreszenzmedium auf Objektträger aufgezogen. Die Objektträger wurden dann in einem Zeiss Axioscop 25 Scanning Mikroskop mit einem planaren 100x oder apochromatischen 63x Ölimmersions-Objektiv bei Verwendung von Standardfiltern analysiert. Spezifisch gefärbte Zellen wurden dann fotografiert und mit der Zeiss Axiovision Software analysiert.

#### **3.2.1.6 Durchflusszytometrie**

Zellen wurden nach dem Ernten zu je 100.000 in Einzelzellsuspension in 1,5ml Eppendorfreaktionsgefäße überführt in mit 5% oder 10% FCS in PBS gewaschen. Dann wurden die Zellen entweder mit Fluorochrom-konjugierten Antikörpern oder mit unkonjugierten Primärantikörpern und mit entsprechenden Fluorochrom-konjugierten

Sekundärantikörpern jeweils 30 min auf Eis inkubiert. Überschüssige Antikörper wurden mit FCS/PBS abgewaschen. Anschließend wurden die Proben mit PI oder 7-AAD als Letalfarbstoff inkubiert. Die Proben wurden dann in FACS-Röhrchen überführt in einem FACSCalibur gemessen. Gated wurde jeweils auf die vitalen Zellen. Negativkontrollen wurden jeweils mit Isotypen durchgeführt. Als Positivkontrolle wurden jeweils mit einem MHC1-spezifische Antikörper (Klon W6/32) markierte Zellen mit untersucht.

### **3.2.1.7 Zellzyklusanalyse**

Geerntete Zellen wurden mit PBS gewaschen und pelletiert. Dann wurden die Zellen in 80% Ethanol resuspendiert und ÜN bei 4°C fixiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit EDTA/PBS gewaschen, wieder pelletiert und 1h bei 4°C mit PI-Lösung und RNase inkubiert. Das PI bindet an doppelsträngige DNA und RNA. Durch die Zugabe von RNase wird die RNA in kleine Stücke zerlegt und kann so leicht bei der FACS-Analyse von DNA diskriminiert werden. Nach einem weiteren Waschschrift mit PBS wurden die Zellen in einem FACSCalibur gemessen. Typischerweise zeigen sich in einem Histogramm, bei dem die Messwerte im dritten Kanal dargestellt werden zwei Peaks. Der linke Peak stellt Zellen mit einem DNA-Gehalt von je 2 Chromosomen dar (2n) was Zellen in der G1/G0 entspricht. Der rechte Peak entspricht Zellen mit je 4 Chromosomen, also Zellen in der G2-Phase oder späten Mitose. Zwischen den Peaks findet man Zellen, die ihre Chromosomen gerade replizieren (S-Phase).

### **3.2.1.8 Proliferationsbestimmung**

Geerntete Zellen wurden zu je 5.000 oder 10.000 bei Tumorzellen, bzw. 50.000 bei Lymphozyten in 50µl Zellkulturmedium auf 96 well Platten verteilt. Dort wurden die Zellen mit Zusatz von 1µCi 3H-Thymidin für 24 oder 48 h inkubiert. Die Zellen wurden dann in einem Harvester geerntet und die Aufnahme an radioaktivem Thymidin wurde in einem Szintillationszähler (Perkin Elmer Life Sciences, Boston, U.S.A.) bestimmt. Proliferierende Zellen bauen das Thymidin in die DNA ein. Schneller wachsende Zellen nehmen proportional zu ihrer höheren Wachstumsrate entsprechend mehr radioaktives Thymidin auf.

### 3.2.1.9 Aktivierung von Natürlichen Killerzellen

Wie bereits beschrieben (Multhoff *et al.*, 2001; Multhoff *et al.*, 1999) wurden zur Aktivierung von Natürlichen Killer Zellen dem Medium 100 IU/ml IL-2 und 2µg/ml TKD-Peptid zugesetzt und die Zellen über Nacht im Brutschrank inkubiert.

### 3.2.1.10 Zytotoxische Untersuchungen

NK-Zellen wurden aus hepariniertem Blut (200ml) von gesunden Spendern gewonnen. Das Blut wurde zuerst über einen Ficoll-Gradienten gereinigt und dann über CD94 Antikörper-basierte magnetische Zellsortierung gewonnen. Das Protokoll entspricht dabei dem für die Aufarbeitung von Zellen mit CD56 beads (MidiMACS, Miltenyi, Bergisch Gladbach, Deutschland) (Gross *et al.*, 2003a). Die Fähigkeit von NK-Zellen Zielzellen zu lysieren wurde dann in einem  $^{51}\text{Cr}$  Release Assay untersucht (MacDonald *et al.*, 1974). Dazu wurden die Zielzellen mit  $^{51}\text{Cr}$  markierten Zielzellen in BZM in 96well Rundbodenplatten für 4h inkubiert. Nach der Inkubationsphase wurden die Überstände gesammelt und in einem Top Counter ausgezählt. Der Prozentsatz der spezifische Lyse wurde nach folgender Formel berechnet:  $(\text{experimentelle Freisetzung} - \text{spontane Freisetzung}) \times 100 / (\text{maximale Freisetzung} - \text{spontane Freisetzung})$ . Der Prozentsatz an spontaner Freisetzung war bei den getesteten Zielzellen immer unter 10%.

## 3.2.2 DNA

### 3.2.2.1 Isolierung von DNA aus Zellen

Die Isolierung von DNA aus menschlichen Zellen erfolgte nach einer Methode beschrieben bei Laird (Laird *et al.*, 1991). Das Protokoll ist für einfache Untersuchungen wie DNA-Fragmentierung geeignet. Für sensiblere Methoden, wie Klonierung, PCR, Sequenzierung o.a. sind andere Methoden mit Phenolextraktion notwendig, um eine höhere Reinheit zu erreichen.

Bei der angewendeten Methode wurden Zellen 2-3 Stunden bei 37°C direkt mit dem DNA-Lysepuffer (1mL pro  $10^6$  Zellen) unter ständigem Rotieren inkubiert. Dann wurde das Lysat mit der gleichen Menge Isopropanol versetzt und weitere 10-20 min inkubiert. Die präzipitierte DNA wurde dann mit einer Pipettenspitze in ein 1,5mL

Eppendorfreaktionsgefäß überführt und mit 500µL DNA-Lösepuffer unter ständigem Rotieren solange bei 37°C inkubiert, bis sich die DNA gelöst (1h-12h) hat. Bis zur Analyse wurde die DNA bei -20° gelagert.

### **3.2.2.2 Agarosegelelektrophorese**

Die gewonnene DNA wurde in einem Photometer auf ihre Konzentration bestimmt. Die DNA Proben wurden bei 260nm und 280nm auf ihre Extinktion geprüft. Die Konzentration berechnet sich nach folgender Formel:

$$C_{\text{DNA}} = (\text{Extinktion bei } \lambda=260\text{nm}) \times 50\mu\text{g/ml} \times \text{Verdünnungsfaktor.}$$

Die Reinheit R lässt sich mit folgender Formel berechnen:

$$R = (\text{Extinktion bei } \lambda=260\text{nm}) / (\text{Extinktion bei } \lambda=280\text{nm}).$$

Der Idealwert liegt bei 1,9. Liegt der Wert darüber, so spricht dies für eine Verunreinigung mit RNA, liegt er darunter so sind andere Verunreinigungen vor allem Proteine dafür verantwortlich. Für die Untersuchung auf DNA-Fragmentierung lagen die Werte zwischen 1,8 und 2,0 und damit im tolerablen Bereich.

Je 1µg genomische DNA wurden dann gelelektrophoretisch in einem 0,8% Agarosegel aufgetrennt. Die DNA wurde dann im Gel mit einer Ethidiumbromid-Lösung angefärbt. Ethidiumbromid lagert sich in die DNA ein, und kann mit Hilfe von UV-Licht sichtbar gemacht werden. Die Gele wurden dann auf einem UV-Illuminator fotografiert.

## **3.2.3 Proteine**

### **3.2.3.1 Zellfraktionierung**

Zur Untersuchung von einzelnen Zellkompartimenten wurden Zellen geerntet und mithilfe von differentieller Zentrifugation oder Dichtegradienten-Zentrifugation fraktioniert.

Alle Proteinextrakte konnten für kurze Zeiträume bei 4°C gelagert werden. Für langfristige Lagerung wurden die Extrakte bei -20°C oder -80°C eingefroren, Auftauen erfolgte bei 4°C oder auf Eis. Proteinlösungen wurden entweder mit PMSF-Lösung (1/50 des

Volmens) oder Protease-Inhibitorcocktail (gem. Herst. Merck) versetzt um enzymatische Degradationen von Proteinen zu vermeiden

#### **3.2.3.1.1     *Zytoplasma***

Zur Gewinnung der zytoplasmatischen Fraktion wurde Zellen mit PBS gewaschen und dann unter gelegentlichen vorsichtigem vortexen 45min auf Eis mit Lysepuffer inkubiert (120mM NaCl, 40mM Tris pH 8,0 und 0,5% Nonidet P40). Pro  $10^6$  Zellen wurden 200 $\mu$ l Puffer eingesetzt. Das Zelllysate wurde dann 15min bei 10.000g in einer Tischzentrifuge bei 4°C zentrifugiert um die unlöslichen Bestandteile abzutrennen. Der anschließende Überstand wurde als Zytoplasmafraktion weiter verwendet.

#### **3.2.3.1.2     *Zellmembran***

Zur Gewinnung der äußeren Plasmamembran wurde ein modifiziertes Protokoll von Weismann (Weissman, 1991) verwendet.  $50 \times 10^6$  Zellen wurde nach 10min Inkubation in hypertonischem Dounce-Puffer mittels eines Homogenisators osmotisch aufgebrochen. Danach wurde dem Zelllysate Tonizitätswiederherstellungspuffer zugegeben (1/100 des Volumens) und wieder physiologischer Salzgehalt hergestellt, um ein Aufbrechen der Zellkerne zu verhindern. Dies hätte zur Folge, dass DNA austritt, was in weiteren Versuchen störend wäre. Nach dem Abtrennen der Zellkerne (500g) und anderer schwerer Zellbestandteile, z.B. Mitochondrien, Lysosomen, Zytoskelett (10.000g) mittels differentieller Zentrifugation wurde die äußere Zellmembran durch differentielle Zentrifugation bei 100.000 g vom Zytosol getrennt. Das resultierende Pellet mit der äußeren Zellmembran wurde dann mit Triton-X 100 gelöst. Triton-X 100 unlösliche Bestandteile wurden dann bei 10.000 g abgetrennt. Die resultierende Fraktion der Plasmamembranfraktion wurde dann auf das Verunreinigungen mit einem Antikörper gegen Lactatdehydrogenase auf zytoplasmatische Verunreinigungen untersucht. Nur bei negativem Ergebnis wurde die Fraktion für weitere Versuche verwendet.



### 3.2.3.1.3 Caveolae

Zur Isolierung von Caveolae (low density membrane fractions) wurden Zellmembranfraktionen mittels Dichtegradientenzentrifugation in einem Saccharosegradienten von dichteren Bestandteilen der äußeren Zellmembran gereinigt (Smart *et al.*, 1994; Pfeiffer *et al.*, 2001). 4ml Polyallomer-Zentrifugenröhrchen (Beckman, Palo Alto, U.S.A.) wurden mit einem Saccharosegradienten gefüllt (Abb. 5).

Es wurden jeweils 0,8ml 0,1M, 1,2ml 0,7M, 0,8ml 0,8M und 0,8ml 0,9M Saccharoselösung eingefüllt, wobei die Lösung mit der höheren Konzentration mit einer langen Kanüle jeweils unterschichtet wurde. Schließlich wurde die zu untersuchende Membranfraktion mit TNX-Puffer resuspendiert und mit einer 2,4M Saccharoselösung auf 1,2M Saccharose eingestellt und im Zentrifugenröhrchen unterschichtet. Die einzelnen

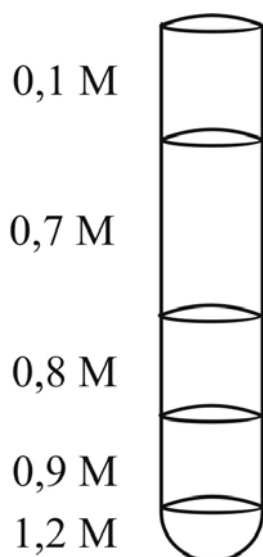


Abb. 5: Schema der Zentrifugenröhrchen zur Isolierung von Caveolae mittels Dichtegradientenzentrifugation.

In Zentrifugenröhrchen (4ml) wurden Saccharose-Lösungen (0,8ml 0,1M, 1,2ml 0,7M, 0,8ml 0,8M, 0,8ml 0,9M) eingebracht. Die Probe wurde in TNX-Puffer suspendiert und mit 2,4M Saccharose-Lösung auf 1,2M Saccharose eingestellt und unter die 0,9M Saccharose untergeschichtet.

Lösungen der Fraktionen wurden so hergestellt, dass die Salzkonzentrationen in allen Lösungen gleich war. Dann wurden die Proben bei 200.000g bei 4°C für 16h zentrifugiert. Nach dem Zentrifugenlauf wurden dem Zentrifugenröhrchen 10 Fraktionen à 400µl (F1 - F10) von oben herab abgenommen und auf Proteingehalt untersucht. Typischerweise befindet sich der Hauptanteil der Gesamtproteinmenge in den Fraktionen F9 und F10. Die Fraktionen, die die für uns interessanten Membranfraktionen mit geringer spezifischer Dichte enthalten sind die Fraktionen F2, F3 und F4. Alle Fraktionen wurden mit Hilfe

eines Western blots auf das Vorhandensein von Caveolin-1 untersucht, das als Marker für Caveolae dient (Smart *et al.*, 1994).

### **3.2.3.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese**

Proteinlösungen wurden nach einem Protokoll von Laemmli (Laemmli, 1970) je nach Proteinkonzentration mit 4x Probenpuffer gemischt, 10 min aufgekocht und in einem 10% Polyacrylamidgel in einer Gelelektrophoresekammer von Hoefer Scientific Instruments (San Francisco, U.S.A.) aufgetrennt.

### **3.2.3.3 Coomassie-Färbung**

Gele, bei denen nur eine grobe Auflösung der Banden erforderlich war, oder die große Mengen an bestimmten Proteinen enthielten, wurden mit Coomassie-Blau gefärbt. Coomassie-Blau färbt unspezifisch alle Proteine an. Allerdings ist die Hintergrundfärbung relativ hoch, so dass nach dem Färben intensives Waschen nötig ist. Die Auflösungsgrenze liegt bei ca. 1 µg eines Protein.

### **3.2.3.4 Silver Staining**

Sollten die Proteine in Polyacrylamidgelen genauer untersucht werden oder schwache Banden sichtbar gemacht werden, so wurden die Gele mit dem Roti-Black P Silver Staining Kit angefärbt (Carl Roth GmbH, Karlsruhe). Im Gegensatz zu Coomassie-Blau liegt die Auflösungsgrenze hier etwa 2-4 Zehnerpotenzen höher im Bereich von 0,1 ng bis 10 ng.

### **3.2.3.5 Western blot**

Nach SDS-PAGE wurden elektrophoretisch aufgetrennte Proteine nach einem Protokoll von Towbin (Towbin *et al.*, 1979) in einer Hoefer Blotting Apparatur (Amersham Biosciences UK Limited, Little Chalfont, U.K.) auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen. Erfolgreiches Blotting wurde anhand einer Ponceau-Lösung überprüft, die unspezifisch alle Proteine anfärbt. Zur weiteren Untersuchung wurden die Membranen mit 5% Trockenmilch (Töpfer) in 0,5% TPBS 1h bei Raumtemperatur geblockt. Die

Inkubation mit primären Antikörpern erfolgte in 1% Milchlösung bei 4°C über Nacht. Nach dreimaligem Waschen in Tween/PBS wurde die Membranen mit entsprechenden HRP-konjugierten Sekundärantikörpern 1h bei RT inkubiert. Spezifische Banden wurden dann mit dem ECL Kit nach Herstellerprotokoll sichtbar gemacht und 1-10 min auf einem Film aufgelegt und in einer AGFA Curix 60 entwickelt. Bei allen Proben wurden Positivkontrollen mitgeführt. Gleiche Beladung der Bahnen wurden anhand von Tubulin überprüft. Fertig inkubierte Membranen wurden nach den Versuchen getrocknet und bei 4°C dunkel und trocken gelagert und gegebenenfalls später noch mit anderen Antikörpern inkubiert.

### **3.2.3.6 Ponceau-Färbung**

Zur Überprüfung eines erfolgreichen Protein-Transfers auf Nitrocellulosemembranen wurden Proteine mit Coomassie-Lösung angefärbt. Coomassie-Lösung färbt unspezifisch alle Proteine an. Die Sensitivität liegt wie bei Coomassie-Blau im Bereich von etwa 1µg eines Proteins. Diese Färbung diente vor allem dazu, den erfolgreichen Proteintransfer von SDS-Gelelektrophorese auf NC-Membranen nachzuweisen.

## **3.2.4 Sonstiges**

### **3.2.4.1 Fotos**

Durchlichtmikroskopische Aufnahmen wurden mit einer Sony Digitalkamera an einem Zellkulturmikroskop von Zeiss (Jena, Deutschland) gemacht.

### **3.2.4.2 Bildbearbeitung**

Digitale Bilder wurden auf einen PC übertragen und mit Adobe Photoshop bearbeitet.

### **3.2.4.3 Statistik**

Fehlerbalken resultieren aus der Standardabweichung oder dem Standardfehler aus der Quantifizierung von mindestens drei voneinander unabhängigen Versuchen.

## 4. Ergebnisse

### 4.1 *Hsp70-Membranexpression auf Tumoren und normalen Zellen*

#### 4.1.1 Vergleich Tumorzelllinien und Normalzellen

Erst seit kurzer Zeit ist die Tatsache bekannt, dass Hsp70 auf der Zellmembran exprimiert wird. Eine ungewöhnliche Expression von Mitgliedern der Hsp70-Familie auf der Oberfläche von Tumorzellen konnte von unterschiedlichen Arbeitsgruppen nachgewiesen werden (Ferrarini *et al.*, 1992; Multhoff *et al.*, 1995b; Altmeyer *et al.*, 1996). In unserer Arbeitsgruppe konnte der Nachweis erbracht werden, dass speziell das durch Stress induzierbare Hsp70 auf einer Reihe von Tumorzellen präsentiert wird. Neben FACS-Analysen konnte mittels Membranpräparation und anschließenden Western blots die Hsp70-Membranexpression bestätigt werden. Um die Frage zu beantworten bei welchen Zellen eine Hsp70-Membranexpression charakteristisch ist, wurden von mir unterschiedliche Tumorzelllinien und Zellen von gesunden Spendern mit Hilfe von FACS-Analysen hinsichtlich ihrer Hsp70-Membranexpression untersucht.

Auf der Zelloberfläche der Kolonkarzinomzelllinie CX-2 (Multhoff *et al.*, 1997) (48,3%; Abb. 6, obere Reihe, Mitte) und der Pankreaskarzinomzelllinie Colo357 konnte eine stabile Hsp70-Membranexpression detektiert werden (53,2%, Abb. 6, obere Reihe rechts). In weiteren Versuchen konnte eine Hsp70-Membranexpression auch auf der myelogenen Leukämiezelllinie K562 erstmals mittels FACS-Analysen nachgewiesen werden (42,0%, Abb. 6 untere Reihe links). Zellen der Zervixkarzinomzelllinie HeLa wiesen hingegen nur zu einem geringen Prozentsatz eine Hsp70-Expression auf (20,2%) (Abb. 6 untere Reihe rechts). Im Gegensatz zu Tumorzelllinien waren PBL gesunder Spender Hsp70-Membran-negativ. Der Peak des Histogramms der mit dem monoklonalen Hsp70-spezifischen Antikörper cmHsp70.1 gefärbten Zellen zeigt gegenüber dem Peak der Isotypenkontrolle keine Verschiebung (Abb. 6, oben links)

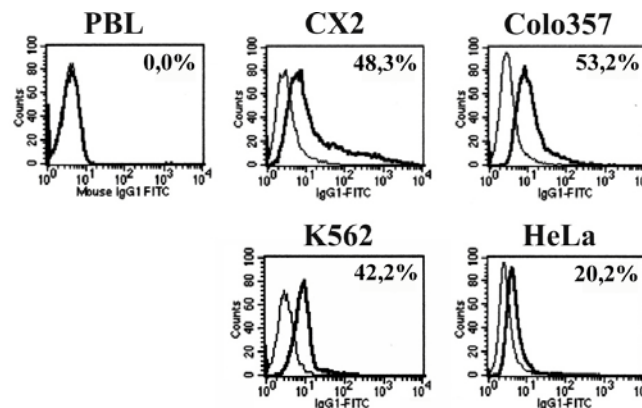


Abb. 6: Hsp70-Membranexpression von Zellen verschiedener Zelllinien.

Je 100.000 Zellen von PBL eines gesunden Spenders sowie von Zellen der Zelllinien CX2, Colo357, K562 und HeLa wurden mit dem Hsp70-spezifischen FITC-konjugierten monoklonalen Antikörper cmHsp70.1 gefärbt und im FACS analysiert (dicke Linie). Als Kontrollen dienten mit FITC-konjugierte Isotypenkontrollen (dünne Linie). Der Prozentsatz der Hsp70-positiven Zellen ist jeweils korrigiert um den Prozentsatz an unspezifisch gefärbt Zellen der Isotypenkontrolle. Als Inlet ist jeweils der korrigierte Prozentsatz angegeben. Die Histogramme der Zellen der Kulturlinien sind repräsentativ für routinemäßig durchgeführte FACS-Analysen. Das Histogramm der PBL ist repräsentativ für regelmäßig im Labor durchgeführte Experimente ( $n > 20$ ).

Unter Verwendung des Hsp70-spezifischen Antikörpers cmHsp70.1 konnten mittels fluoreszenzaktivierter Zellsortierung aus der Pankreaskarzinomzelllinie Colo357 zwei Subzelllinien generiert werden, von denen eine Hsp70 stark und die andere schwach auf der Membran exprimierte. Die Sortierung erfolgte nach dem Protokoll, das bereits für die Kolonkarzinomzelllinie CX-2 verwendet wurde (Multhoff *et al.*, 1997). Die Zellen der Subzelllinie CX+ exprimierten zu etwa 80% Hsp70 (Abb. 7 oben links), die der Sublinie CX- zu etwa 20% (Abb. 7, unten links). Die Zellen der gesorteten Subzelllinien Colo+ exprimierten zu etwa 60% Hsp70 auf der Zelloberfläche (Abb. 7, oben rechts), die der Subzelllinie Colo- zu etwa 40% (Abb 7, unten rechts).

Alle Zelllinien wurden routinemäßig hinsichtlich ihrer Hsp70-Membran-Expression überprüft. Parallel dazu wurden die Zellen auf die Expression von MHC I-Molekülen auf der Zelloberfläche überprüft. Die MHC Klasse I Expression diente als Positivkontrolle bei

durchflussszytometrischen Untersuchungen. Der Prozentsatz der MHC I-positiven Zellen lag bei allen von mir untersuchten Zelllinien über 95% (ohne Daten).

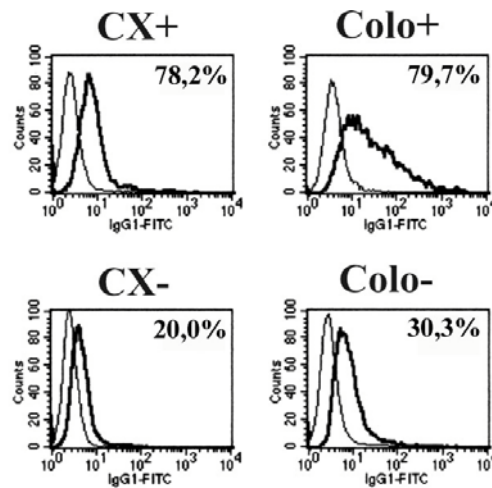


Abb. 7: Hsp70-Membranexpression der Subzelllinien CX+ , CX-, Colo+ und Colo-.

Je 100.000 Zellen der Tumorsubzelllinien wurden mit dem Hsp70-spezifischen FITC-konjugierten monoklonalen Antikörper cmHsp70.1 gefärbt und im FACS analysiert (dicke Linie). Als Kontrollen dienten mit FITC-konjugierte Isotypenkontrollen (dünne Linie). Der Prozentsatz der Hsp70-positiven Zellen ist jeweils korrigiert um den Prozentsatz an unspezifisch gefärbt Zellen der Isotypenkontrolle. Als Inlet ist jeweils dieser korrigierte Prozentsatz angegeben. Die Histogramme sind repräsentativ für routinemäßig durchgeführte FACS-Analysen.

#### 4.1.2 Vergleich Tumorbiopsiematerial, Knochenmarkproben und Normalgewebe

Um die *in vitro* an Zelllinien gewonnenen Daten zu überprüfen, wurden Tumorbiopsien von Patienten hinsichtlich ihrer Hsp70-Expression untersucht. Nachfolgend möchte ich die Ergebnisse der von mir durchgeführten Untersuchungen an Melanomen genauer beschreiben.

Obgleich eine Reihe Melanom-assoziiierter Marker bekannt waren, gab kein Marker bislang Auskunft über die Prognose, die Heilungsaussicht oder über das

Metastasierungspotential des Tumors. Bei meinen Untersuchungen verwendete ich neben dem Hsp70-spezifischen cmHsp70.1 Antikörper gegen die Marker Mel-1, Mel-2 (Barral *et al.*, 1997) und Mel-5 (Bhawan, 1997). Diese Antikörper wurden zusammen mit dem monoklonalen Hsp70-spezifischen Antikörper cmHsp70.1 in Multiparameter-FACS-Analysen verwendet. Alle untersuchten Melanomzellen waren zumindest teilweise für den Marker Mel-1 positiv (Abb. 8, 2. Diagramme von oben). Mel-1 ist ein Gangliosid, das auf Melanomen und neuroektodermalen Zellen exprimiert wird. Auch für Mel-2, ein hochmolekulares Proteoglycan, waren alle von mir untersuchten Melanomzellen stark positiv (Abb. 8, 3. Diagramme von oben). Mel-2 wird auch auf Astrozytomen, auf normalen Keratinozyten und endothelialen Zellen exprimiert. Im Gegensatz zu Mel-1 und Mel-2 konnten deutliche Unterschiede bei verschiedenen Melanomzellen bezüglich der Mel-5-Expression festgestellt werden. Der Antikörper gegen Mel-5 detektiert ein Pigmentierungs-assoziiertes Glycoprotein, das auf normalen Melanozyten und Naevi, und weniger häufig auf malignen Melanomzellen exprimiert wird (Bhawan, 1997). In Abb. 8 sind beispielhaft die Analysen der Melanome mm44 und mm63 dargestellt. Bemerkenswerterweise waren Zellen von Melanomen, die Hsp70-positiv waren für Mel-5 negativ und umgekehrt. Diese Eigenschaft konnte auf anderen Melanomen bestätigt werden (Farkas *et al.*, 2003). Melanom-assoziierte Fibroblasten waren immer Hsp70-negativ. Sie konnten anhand des Fibroblasten-spezifischen Antikörpers AS02 von Melanomzellen in FACS-Analysen unterschieden werden. Weiterhin wurden zur Kontrolle humane Hautfibroblasten und Melanozyten gesunder Spender auf eine potentielle Hsp70-Expression untersucht. Analog der PBL gesunder Spender waren auch diese gesunden Zellen Hsp70-negativ (Farkas *et al.*, 2003).

Weiterhin untersuchte ich auch Zellen aus Biopsiematerial anderer solider Tumoren. Auf Kolorektal-, Lungen- und Pankreas-Karzinomen, sowie auf leukämischen Blasten konnte von unserer Arbeitsgruppe eine Hsp70-Membranexpression nachgewiesen werden, während Normalgewebe des gleiches Spenders Hsp70-negativ war (Hantschel *et al.*, 2000). Untersuchungen von Knochenmarkproben von Patienten mit Akuter Myeloischer Leukämie (AML) ergaben einen hohen Prozentsatz Hsp70-positiver Tumoren. Die Hsp70-Positivität bei AML konnte mit der Schwere der Krankheit, der schlechten Therapierbarkeit, sowie verschiedenen Chromosomenaberrationen in Verbindung gebracht werden (Gehrmann *et al.*, 2003b).

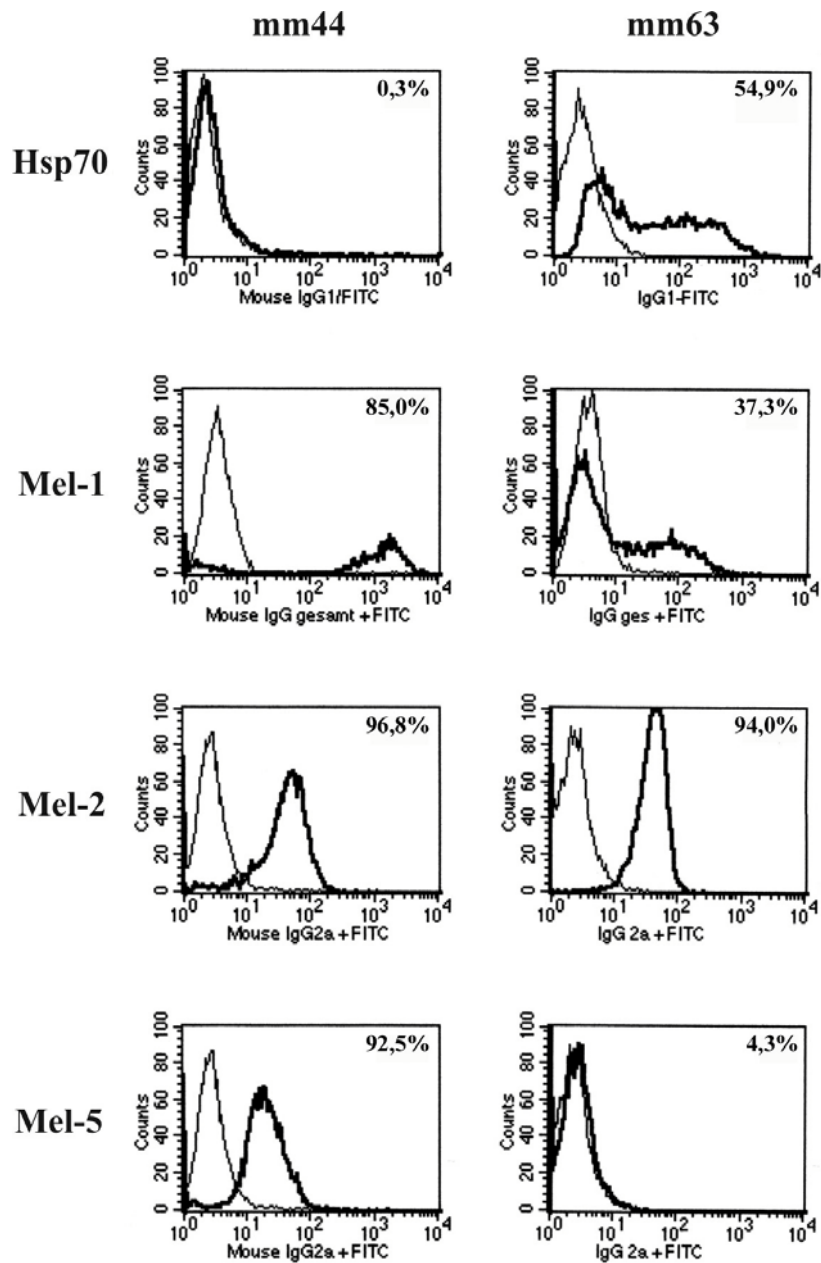


Abb. 8: Die Expression von Hsp70, Mel-1, Mel-2 und Mel-5 auf Zellen von Melanomen.

Biopsiematerial von Melanompatienten wurde in Kurzkultur genommen. Je 100.000 Zellen wurden auf Eis für 30min in Dunkelheit mit den angegebenen Antikörpern inkubiert und nach einem Waschgang mit einem entsprechenden FITC-konjugierten Sekundärantikörper inkubiert. Vitale Zellen wurden dann auf die Marker im FACS analysiert (dicke Linien). Als Kontrollen dienten Zellen, die mit Immunglobulinen des gleichen Isotyps markiert waren (dünne Linien). Der Prozentsatz an Positivität (Inlets) ergibt sich aus der Differenz des Prozentsatzes spezifisch gefärbter Zellen minus des der Isotypenkontrollen.



## 4.2 Effekte antineoplastischer Reagenzien

### 4.2.1 Definition nicht-toxischer Konzentrationen

Die Untersuchungen von Tumorzelllinien, Primärmaterial und gesundem Gewebe haben gezeigt, dass die Membranexpression von Hsp70 auf bestimmte maligne Erkrankungen mit unterschiedlicher Ausprägung beschränkt ist und dass gesunde Zellen Hsp70-negativ sind. Da aus vorherigen Untersuchungen bekannt war, dass NK-Zellen selektiv Hsp70-positve Zellen lysieren (Multhoff *et al.*, 2001; Multhoff *et al.*, 1997), war von besonderer klinischer Bedeutung, ob die Hsp70-Membranexpression durch bekannte Tumorthapien modifiziert werden kann.

Zunächst wurde von mir der nicht-letale Konzentrationsbereich der Reagenzien bestimmt. Dazu wurden Zellen der myeloiden Leukämiezelllinie K562 ohne Vorbehandlung oder nach 2-stündigem Hitzeschock (41,8°C), für weitere 2 Stunden mit den Zytostatika Cytarabin, Ifosfamid, Vincristin oder Paclitaxel (Konzentrationen 10nm, 1µM oder 100µM) inkubiert. Die Vitalität wurde mit Hilfe der Trypanblau-Ausschluß-Methode vor der Präparation von Zellextrakten oder mit Propidiumiodid direkt während der FACS-Analyse bestimmt.

Tab. 1: Vitalität von K562 Zellen nach Behandlung mit Zytostatika.

Temperatur	Zytostatikum	10nM	1µM	100µM	Kontrolle
% vitale K562 Zellen					
37°C	Cytarabin	100±0,5	99±1,5	99±0,0	99±0,0
	Ifosfamid	100±1,0	97±0,0	98±1,5	99±0,0
	Vincristin	99±0,5	96±0,5	28±5,9	99±0,0
	Paclitaxel	99±0,0	96±0,0	71±12,1	99±0,0
41,8°C	Cytarabin	98±0,5	98±0,0	97±1,0	99±0,1
	Ifosfamid	99±0,5	99±0,0	94±5,6	99±0,2
	Vincristin	99±0,0	97±0,0	92±2,9	99±0,0
	Paclitaxel	99±0,5	100±0,5	91±3,2	99±0,0

K562 Zellen wurden mit Cytarabin, Ifosfamid, Vincristin oder Paclitaxel in den Konzentrationen 10nm, 1µM oder 100µM inkubiert. Die Vitalität wurde mit Trypanblau oder Propidiumiodid untersucht. Die Daten stammen aus 3 - 4 voneinander unabhängigen Experimenten ± SD. (nach Gehrmann *et al.* (2002))

Wie in Tabelle 1 zu sehen, wurde erst ab einer Konzentration von 100 $\mu$ M bei Vincristin und Paclitaxel die Vitalität der Zellen negativ beeinflusst. Die Verminderung der Vitalität war bei vorher hitzegeschockten Zellen weniger stark ausgeprägt. Die Konzentrationen von 10nM und 1 $\mu$ M wurden sowohl unter physiologischen Bedingungen, als auch nach Hitzeschock als nicht toxisch für K562 Zellen eingestuft. Vergleichbare Ergebnisse wurden mit Peripheren Blutlymphozyten (PBL) von gesunden Spendern erzielt (Daten nicht gezeigt).

Die Effekte der verschiedenen Zytostatika auf die Induktion von Apoptose wurde anhand von einer Annexin-FITC-Färbung und anschließender FACS-Analyse untersucht. Bei einer Konzentration von 1 $\mu$ M ließ sich bei keinem der Zytostatika bei unbehandelten oder vorher hitzegeschockten K562 Zellen eine signifikante Apoptose nach 24h feststellen. Wie in Abb. 9a gezeigt, war der Anteil an apoptotischen Zellen nach Hitzeschock (41,8°C) nicht signifikant höher als unter physiologischen Bedingungen (37°C) (11% gegenüber 5%).

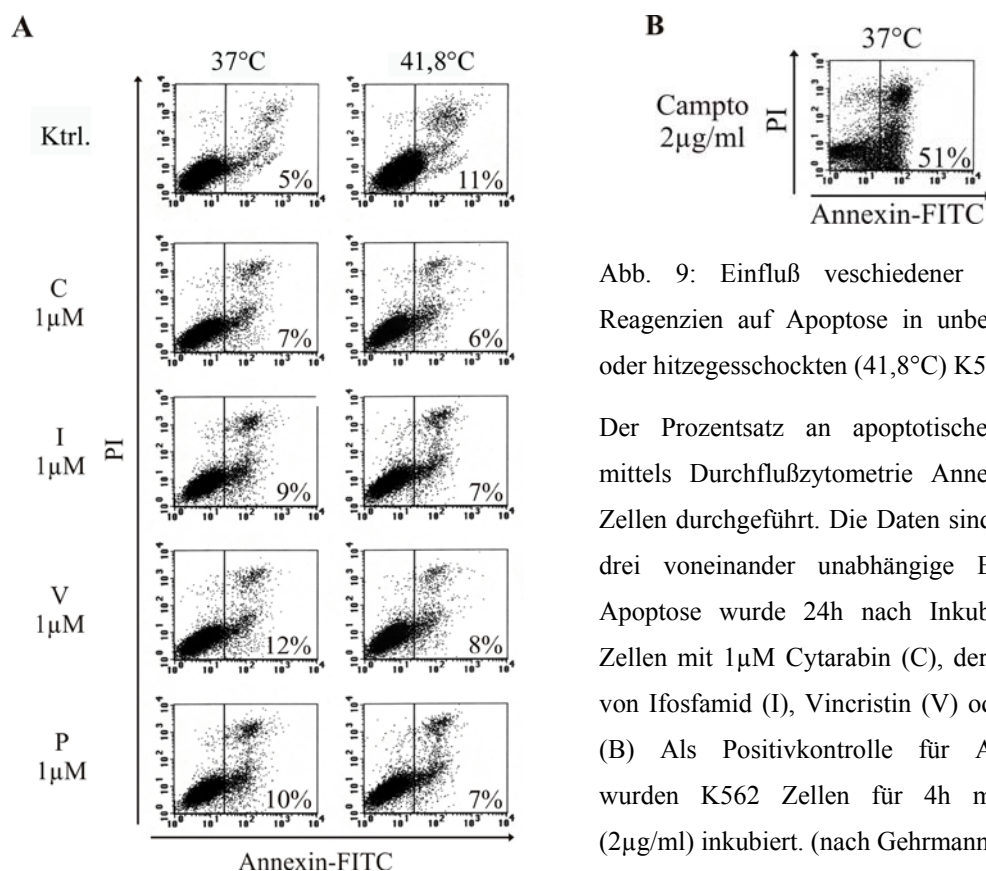


Abb. 9: Einfluß verschiedener antineoplastischer Reagenzien auf Apoptose in unbehandelten (37°C) oder hitzegeschockten (41,8°C) K562 Zellen.

Der Prozentsatz an apoptotischen Zellen wurde mittels Durchflußzytometrie Annexin-V markierter Zellen durchgeführt. Die Daten sind repräsentativ für drei voneinander unabhängige Experimente. (A) Apoptose wurde 24h nach Inkubation von K562 Zellen mit 1 $\mu$ M Cytarabin (C), der aktivierten Form von Ifosfamid (I), Vincristin (V) oder Paclitaxel (P). (B) Als Positivkontrolle für Apoptoseinduktion wurden K562 Zellen für 4h mit Camptothecin (2 $\mu$ g/ml) inkubiert. (nach Gehrmann *et al.* (2002))

Nach Behandlung mit Zytostatika lag der Anteil an apoptotischen Zellen im Bereich von 5% bis 12% und war somit nicht signifikant höher als bei Kontrollzellen. Diese Daten konnten durch Untersuchungen der DNA-Fragmentierung bestätigt werden. Bei Konzentrationen der Zytostatika von 10nM oder 1µM konnte keine Fragmentierung der DNA festgestellt werden. Bei 100µM, sowie bei mit Camptothecin behandelten Zellen war die DNA deutlich fragmentiert wie ich nach elektrophoretischer Auftrennung der DNA in Agarosegelen feststellen konnte (Daten nicht gezeigt).

So konnte ich davon ausgehen, dass eine Zytostatika-Konzentration von 1µM in Tumorzellen weder nekrotischen noch apoptotischen Zelltod hervorruft. Als Positivkontrolle wurden Zellen mit Camptothecin behandelt. Inkubation von K562 Zellen mit einer Konzentration von 2µg/ml für 4h ließ den Anteil der Annexin-positiven Zellen signifikant von 5% auf 51% steigen (Abb. 9b). Behandlung von K562 Zellen mit den Zytostatika bei Konzentrationen von 100µM führte zu einem vergleichbaren Anstieg an Apoptose im Bereich von 30% bis 70% (Daten nicht gezeigt).

#### **4.2.2 Zytoplasmatische Hsp70-Expression**

Um die Induzierbarkeit von Hsp70 in K562 Zellen durch Zytostatika zu untersuchen, wurden Zellen unter physiologischen Bedingungen (37°C) oder nach Hitzeschock (41,8°C) mit Cytarabin, der aktivierten Form von Ifosfamid, Vincristin oder Paclitaxel mit der nicht-toxischen Konzentrationen (10nM oder 1µM) oder der letalen Konzentration von 100µM inkubiert. Nach einer Erholungsphase von 2h bei 37°C wurde das Zytoplasma gewonnen und die Proteine wurde auf einem SDS-Gel aufgetrennt. Mittels Western blot Analysen und unter Verwendung des monoklonalen Hsp70-Antikörpers cmHsp70.1 wurde der zytoplasmatische Gehalt an Hsp70 densitometrisch bestimmt. Eine Färbung mit einem Aktin-spezifischen Antikörper zeigte, dass identische Proteinmengen aufgetragen wurden.

Wie in Abb. 10a zu sehen blieben die zytoplasmatischen Hsp70-Mengen nach Inkubation mit Cytarabin und Ifosfamid bei den getesteten Konzentrationen von 10nM bis 100µM unverändert. Vergleichbare Resultate wurden mit den anderen DNA- und RNA-interagierenden Reagenzien Carboplatin, Doxorubicin oder Fludarabin erzielt. Doxorubicin ist ein Mitglied der Anthracyclin-Familie, das in die DNA interkaliert und das Aufwinden der DNA unterstützt. Fludarabin ist vor allem für langsam replizierende Zellen

zytotoxisch, da es mit der DNA während der Strangbruchreparatur interagiert. Im Gegensatz zu den DNA-interkalierenden Reagenzien verursachten nicht-letale Konzentrationen ( $1\mu\text{M}$ ) der Tubulin-interagierenden Reagenzien, Vincristin und Paclitaxel, einen Anstieg des zytoplasmatischen Hsp70. Bei Vincristin betrug der Anstieg 38% und bei Paclitaxel 36%. Die Daten zeigen die Mittelwerte aus drei voneinander unabhängigen Versuchen. Signifikante Unterschiede sind in Abb. 10 mit Sternchen versehen. Bei einer Konzentration von  $100\mu\text{M}$  konnte kein Anstieg des zytoplasmatischen Hsp70-Gehalts festgestellt, da die Vitalität der K562 Zellen negativ beeinflusst wurde: Reduktion bei Vincristin auf 28% und bei Paclitaxel auf 71% (Tab. 1). Deshalb war es nicht verwunderlich, dass kein Anstieg der Hsp70-Synthese beobachtet wurde. Zusätzlich zu K562 Zellen wurde die Kolonkarzinomzelllinie CX2 mit verschiedenen Zytostatika mit der nicht-letalen Konzentration von  $1\mu\text{M}$  behandelt. Ähnlich wie bei den K562 Zellen beeinflusste eine Cytarabin- und Ifosfamid-Behandlung die zytoplasmatische Hsp70-Menge nicht. Vincristin und Paclitaxel hingegen erhöhten die Menge an zytoplasmatischem Hsp70 im Bereich von 20% bis 25% (Daten nicht gezeigt).

Weiterhin stellte ich mir die Frage, ob eine kombinierte Behandlung aus nicht-letalem Hitzeschock in Verbindung mit Zytostatika die zytoplasmatische Hsp70-Expression steigert. Übereinstimmend mit vorher veröffentlichten Daten (Botzler *et al.*, 1999) konnten ich zeigen, dass ein nicht-letaler Hitzeschock bei  $41,8^\circ\text{C}$  eine 1,3- bis 2,5-fache Steigerung von zytoplasmatischem Hsp70 verursacht. Bei einer kombinierten Behandlung von Hitze plus Zytostatika konnte bei den DNA-interagierenden Agentien Cytarabin, Ifosfamid, Carboplatin, Doxorubicin und Fludarabin kein Unterschied in der zytoplasmatischen Hsp70-Menge im Vergleich zu einer Hitzeschock-Behandlung feststellen. In Abb. 10B ist die relative Menge an zytoplasmatischen Hsp70 nach Hitzeschock, plus Zytostatika-Behandlung mit Cytarabin, Ifosfamid, Vincristin und Paclitaxel aufgetragen. Zusätzlich ist jeweils ein typischer Western blot abgebildet. Im Gegensatz zu den DNA-interagierenden Agentien Cytarabin und Ifosfamid, verursachen Hitze plus Vincristin oder Paclitaxel eine signifikante Steigerung an zytoplasmatischem Hsp70 bei einer Konzentration von  $1\mu\text{M}$  (26% und 40%) (Abb. 10 B). Entsprechend der reduzierten Vitalität der Zellen lässt sich bei  $100\mu\text{M}$  kein Anstieg an zytoplasmatischem Hsp70 feststellen.

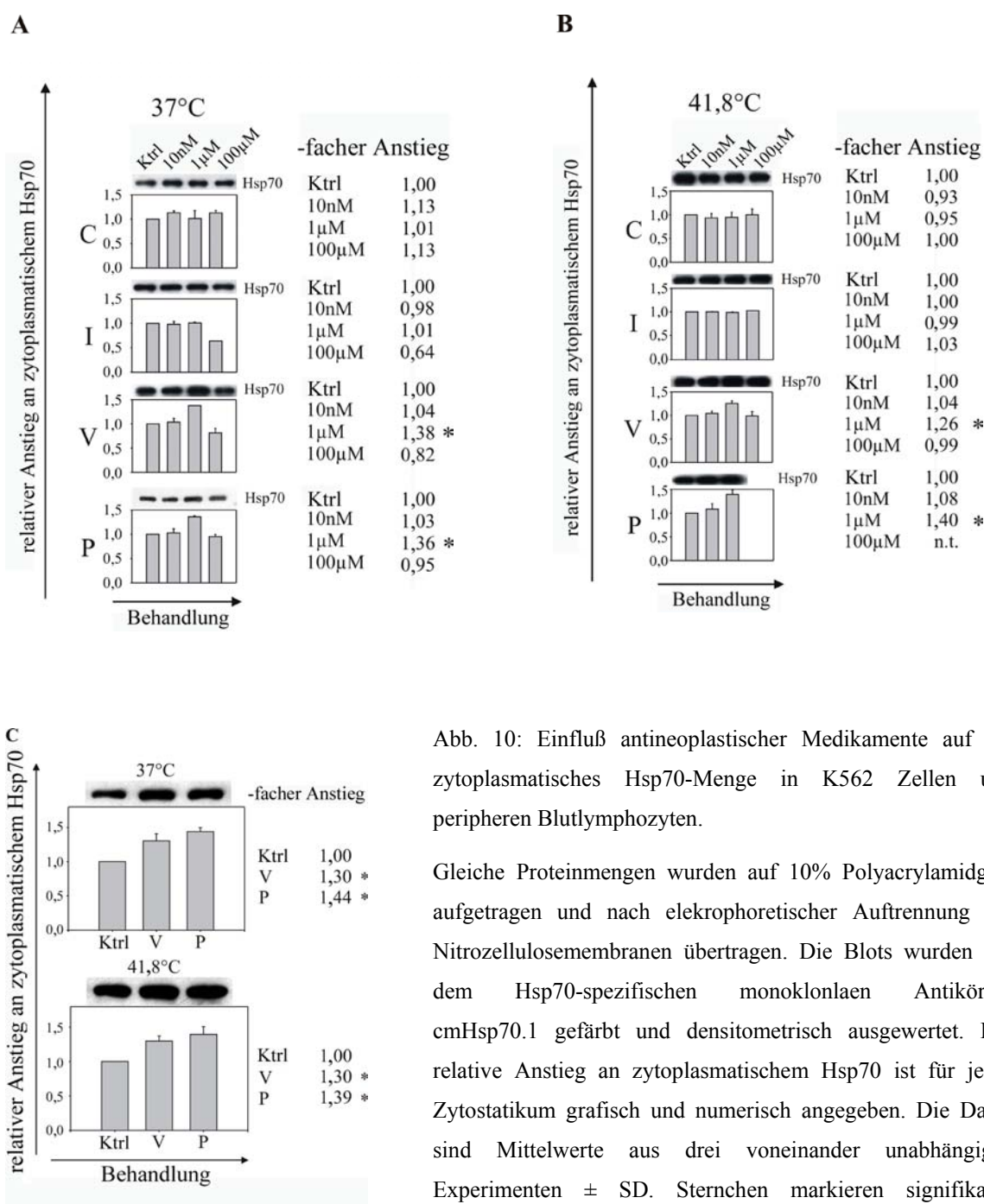


Abb. 10: Einfluß antineoplastischer Medikamente auf die zytoplasmatische Hsp70-Menge in K562 Zellen und peripheren Blutlymphozyten.

Gleiche Proteinmengen wurden auf 10% Polyacrylamidgele aufgetragen und nach elektrophoretischer Auftrennung auf Nitrozellulosemembranen übertragen. Die Blots wurden mit dem Hsp70-spezifischen monoklonalen Antikörper cmHsp70.1 gefärbt und densitometrisch ausgewertet. Der relative Anstieg an zytoplasmatischem Hsp70 ist für jedes Zytostatikum grafisch und numerisch angegeben. Die Daten sind Mittelwerte aus drei voneinander unabhängigen Experimenten  $\pm$  SD. Sternchen markieren signifikante Unterschiede zu den korrespondierenden Kontrollen. Die Inserts zeigen jeweils einen repräsentativen Western blot. (A)

Representative Hsp70-Immunoblots von K562 Zellen (37°C), die ohne Zytostatikum (Ktrl), mit 10nM, 1µM oder 100µM von Cytarabin (C), der aktivierten Form von Ifosfamid (I), Vincristin (V) oder Paclitaxel (P) inkubiert wurden. (B) Representative Hsp70-Immunoblots von vorher hitzegeschockten (41,8°C) K562 Zellen die ohne Zytostatikum (Ktrl), mit 10nM, 1µM oder 100µM von Cytarabin (C), der aktivierten Form von Ifosfamid (I), Vincristin (V) oder Paclitaxel (P) inkubiert wurden. (C) Representative Hsp70 Immunoblots von PBL, die entweder bei physiologischer Temperatur (37°C) oder nach Hitzeschock (41,8°C) ohne (Ktrl) oder mit Vincristin (V) oder Paclitaxel (P) inkubiert wurden. (nach Gehrmann *et al.* (2002)).

Als Kontrolle wurde die Hsp70-Expression vor und nach identischer Behandlung in PBL gesunder Spender untersucht. Wie in Abb. 10C gezeigt war der zytoplasmatische Hsp70-Gehalt nach Behandlung mit 1µM Vincristin oder Paclitaxel mit dem von K562 Zellen vergleichbar, sowohl unter physiologischen Bedingungen bei 37°C (Vincristin 37%, Paclitaxel 44%) als auch nach vorherigem Hitzeschock (Vincristin 30%, Paclitaxel 39%). Die Daten in Abb. 4 representieren die Durchschnittswerte aus drei voneinander unabhängigen Experimenten, die Inserts stellen jeweils eine representative Western blot Analyse dar.

Die Daten zeigen, dass die Behandlung mit den Tubulin-interagierenden Zytostatika Vincristin und Paclitaxel im Zytoplasma sowohl bei Tumorzellen als auch bei normalen Zellen zu einem Anstieg des Hsp70-Gehaltes führen. Bei Behandlung von Zellen mit den untersuchten DNA-interagierenden Zytostatika ließ sich kein Anstieg des Hsp70-Gehaltes induzieren.

#### **4.2.3 Hsp70-Membranexpression**

Zusätzlich zu seiner Funktion als Chaperone ist bekannt, dass Hsp70 die Aktivität von NK-Zellen steigern kann. Membran-gebundenes Hsp70 dient als tumor-spezifische Erkennungsstruktur (Multhoff *et al.*, 1997; Multhoff *et al.*, 1999). Um immunologische Effekte der Zytostatika Cytarabin, Ifosfamid, Vincristin und Paclitaxel abschätzen zu können, untersuchte ich die Membranexpression von Hsp70 vor und nach Behandlung. Es galt die Frage zu klären, ob eine gesteigerte zytoplasmatische Hsp70-Expression mit der Menge an Membran-gebundenem Hsp70 korreliert. Wie in 4.2.2 beschrieben wurde auch hier die nicht-letale Konzentration von 1µM der Zytostatika Cytarabin, Ifosfamid, Vincristin und Paclitaxel eingesetzt. Nach Behandlung der Zellen wurden die Plasmamembranen isoliert und die Proteine dieser Fraktion mittels Western blot Analysen untersucht. Ein repräsentativer Western blot aus 3 Experimenten mit dem monoklonalen Hsp70-spezifischen Antikörper cmHsp70.1 ist in Abb. 11A gezeigt. Eine quantitative Auswertung der Resultate ist in Abb. 11B zusammengefasst. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der zytoplasmatischen Hsp70-Mengen lässt sich sowohl durch Vincristin, als

auch durch Paclitaxel die Hsp70-Membranexpression sowohl in nicht-vorbehandelten als auch in hitzegeschockten K562-Zellen steigern.

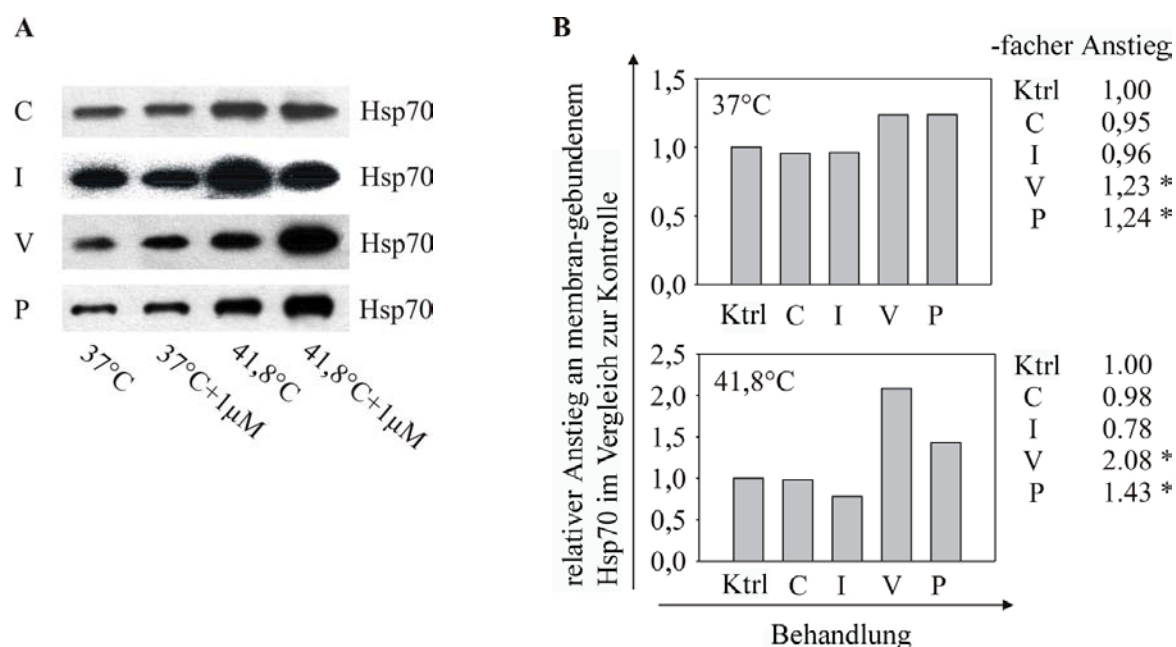


Abb. 11: Einfluß antineoplastischer Medikamente auf Membran-gebundenes Hsp70 in K562 Zellen.

Gleiche Proteinmengen wurden auf 10% Polyacrylamidgele aufgetragen, elektrophoretisch aufgetrennt und auf Nitrocellulosemembranen übertragen. Western blots wurden mit dem Hsp70-spezifischen monoklonalen Antikörper durchgeführt. (A) Representative Immunoblots von unbehandelten (37°C) oder hitzegeschockten (41,8°C) K562 Membranfraktionen nach Inkubation mit 1µM Cytarabin (C), der aktivierten Form von Ifosfamid (I), Vincristin (V) oder Paclitaxel (P). (B) Quantitative Analyse der Immunoblots durch Densitometrie. Die relative Veränderung an Membran-gebundenem Hsp70, bezogen auf unbehandelte Kontrollzellen, ist für jedes Zytostatikum grafisch und numerisch (-facher Anstieg) dargestellt. Die Daten sind repräsentativ für drei voneinander unabhängige Experimente. Sternchen weisen auf signifikanten Unterschiede bezüglich der Kontrolle hin. (nach Gehrmann *et al.* (2002))

Unter physiologischen Temperaturbedingungen (37°C) stieg der Anteil nach Vincristinbehandlung um 23% und um 24% nach Paclitaxelbehandlung. Nach vorherigem Hitzeschock verdoppelte sich die Hsp70-Menge durch Vincristin und steigerte sich um 43% nach Paclitaxelbehandlung. Ebenso wie für den Zytoplasmagehalt gezeigt, hatten Cytarabin und Ifosfamid keinen Einfluß auf die Hsp70-Membranexpression.

Da Membranpräparationen zytoplasmatische Verunreinigungen enthalten können, wurde der Anstieg an Membran-gebundenem Hsp70 zusätzlich noch durch FACS-Analysen von vitalen Zellen mit intakter Zellmembran bestätigt. Obwohl die numerischen Werte aus Western blots und FACS-Analysen nicht direkt miteinander verglichen werden können, zeigten beide Versuche ein vergleichbares Muster. Wie in Abb. 12A (Diagramme links) zu sehen, resultierte die Inkubation der K562 Zellen mit Vincristin oder Paclitaxel in einem

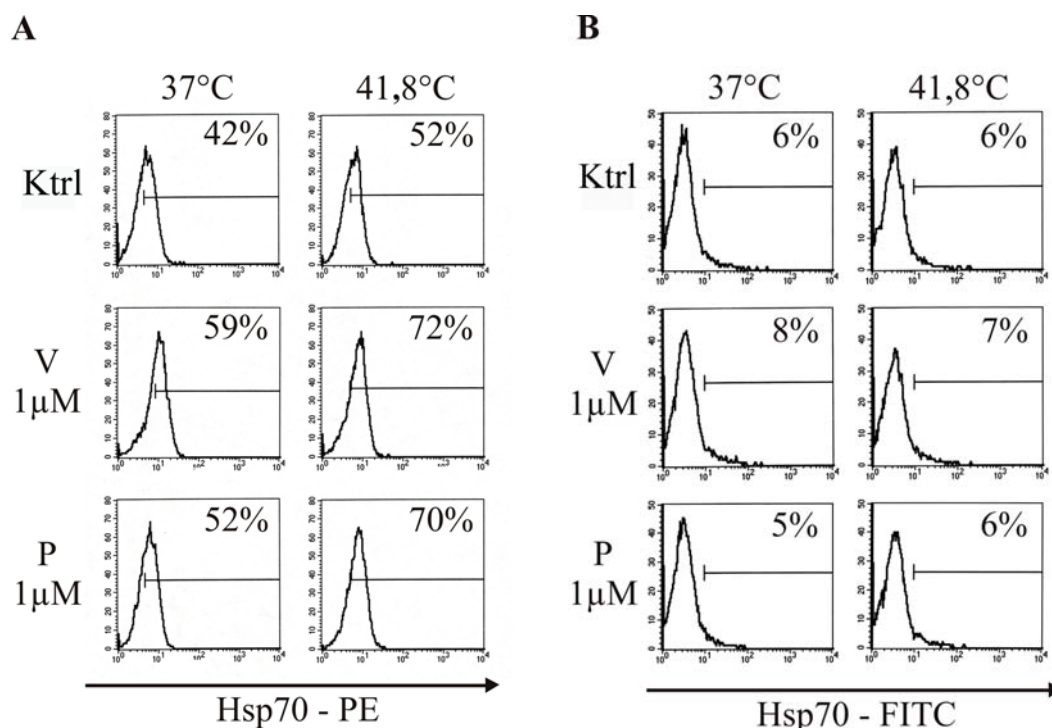


Abb. 12: Durchflußzytometrische Analyse von Membran-gebundenem Hsp70 auf K562 Zellen und PBL. Gezeigt ist eins von drei representativen Experimenten. (A) Unbehandelte (37°C) oder hitzegeschockte (41,8°C) K562 Zellen wurden mit 1μM Vincristin (V) oder 1μM Paclitaxel (P) inkubiert und mit dem FITC-konjugierten Hsp70-spezifischen monoklonalen Antikörper (cmHsp70.1, siehe Material und Methoden) markiert (durchgezogene Linie in den Histogrammen). Der Marker zeigt die Position der mit dem Isotyp markierten Kontrollzellen. Der Prozentsatz der Hsp70-positiv markierten Zellen steht jeweils in der rechten oberen Ecke jedes Histogramms. (B) Unbehandelte (37°C) oder hitzegeschockte (41,8°C) PBL von gesunden Spendern wurden wie die K562 Zellen behandelt und mit dem Hsp70-spezifischen monoklonalen Antikörper (mcHsp70.1) markiert. Der Marker zeigt die Position der mit dem Isotyp markierten Kontrollzellen. Der Prozentsatz der Hsp70-positiv markierten Zellen steht jeweils in der rechten oberen Ecke jedes Histogramms. (nach Gehrman *et al.* (2002))



signifikanten Anstieg der Hsp70-positiven Zellen. Inkubation der K562-Zellen mit Cytarabin oder Ifosfamid hatte keinen Einfluß auf den Anteil der Hsp70-positiven Zellen (Daten nicht gezeigt). Verglichen mit unbehandelten Kontrollzellen stieg der Anteil Hsp70-positiver Zellen von 42% auf 59% bei Vincristin und auf 52% bei Paclitaxel. Die Prozentsätze Hsp70-positiver Zellen sind in der rechten oberen Ecke jedes Diagramms dargestellt. Vergleichbare Resultate konnten mit hitzegeschockten Zellen erzielt werden. Hitze alleine steigerte den Prozentsatz positiver Zellen von 42% auf 52%. Eine zusätzliche Behandlung mit Zytostatika ließ den Anteil Hsp70-positiver Zellen von 52% auf 72% bei nicht-letaler Behandlung mit Vincristin und auf 70% nach nicht-letaler Behandlung mit Paclitaxel steigen (Abb. 12A, rechte Spalte). Ähnliche Ergebnisse wurden in einer zweiten Tumormodellzelle, der humanen Kolonkarzinomzelllinie CX2 erzielt (Daten nicht gezeigt). Wie in Abb. 12B zu sehen, konnte der Anteil an Hsp70-positiven Zellen aus PBL gesunder Spender mit 1µM Vincristin oder Paclitaxel weder unter physiologischen Bedingungen noch nach vorherigem Hitzeschock oder kombinierter Behandlung induziert werden. Diese Resultate konnten durch Plasmamembranpräparationen von PBL bestätigt werden (Daten nicht gezeigt).

Aus diesen Daten konnte ich schließen, dass im Zytoplasma Hsp70 in normalen Zellen und in Tumorzellen vergleichbar induzierbar wurde. Im Gegensatz dazu wurde eine gesteigerte Membranlokalisierung von Hsp70 nach Hitze/Zytostatika-Behandlung (Vincristin und Paclitaxel) nur in Tumorzellen induziert.

#### 4.2.4 Tubulinaggregate

Die bisherigen Daten zeigten, dass nach Behandlung mit nicht-letalen Mengen der Tubulin-interagierenden Zytostatika Vincristin und Paclitaxel die Menge an zytoplasmatischem Hsp70 in normalen Zellen und Tumorzellen vergleichbar stark anstiegen. Im Gegensatz dazu hatten DNA-interagierende Agentien unter vergleichbaren nicht-letalen Bedingungen keinen Einfluß auf die Hsp70-Expression. Da Proteinaggregate bekannterweise die Synthese von Hsp70 induzieren (Ait-Aissa *et al.*, 2000), war es für mich von Interesse, ob nicht-letale Konzentrationen von Vincristin oder Paclitaxel eine Tubulinaggregation induzieren. Dazu wurden Vincristin- und Paclitaxel-behandelte K562-Zellen mit einem Tubulin-spezifischen Antikörper markiert und fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Wie in Abb. 13 oben zu sehen zeigen unbehandelte

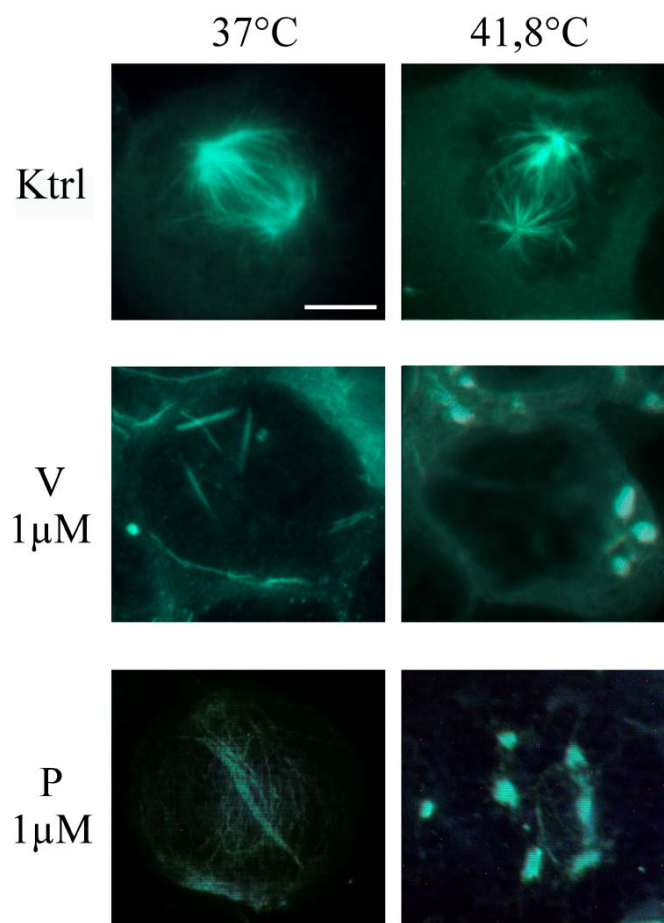


Abb. 13: Tubulinmarkierung von K562 Zellen mit Fluoreszenzfarbstoff.

Unbehandelte (37°C) oder hitzegeschockte (41,8°C) K562 Zellen wurden mit 1µM Vincristin (V) oder 1µM Paclitaxel inkubiert. Unbehandelte oder zytostatika-behandelte Zellen wurden auf Objektträger transferiert und mit 4% Paraformaldehyd fixiert. Daraufhin wurden die Zellen mit einem Tubulin-spezifischen Antikörper inkubiert und mit einem FITC-konjugierten Sekundärantikörper gefärbt. Maßstab: 10µM (nach Gehrmann *et al.* (2002)).

Kontrollzellen sowohl bei 37°C oder 41,8°C eine regelmäßige Mikrotubuliformationen. Im angegebenen Beispiel ist eine mitotische Zelle dargestellt. Nach Behandlung mit den tubulininteragierenden Zytostatika waren fast keine mitotischen Zellen zu finden und das tubuläre Netzwerk war in allen Zellen gestört. Zellen, die mit 1µM Vincristin unter physiologischen Bedingungen inkubiert wurden, wiesen Tubulinstapel im Zytoplasma auf

(Abb. 13, Mitte links). Nach Hitzeschock war die Bildung von Tubulinstapeln noch ausgeprägter (Abb. 13, Mitte rechts). Eine Behandlung mit 1  $\mu$ M Paclitaxel induzierte eine vergleichbare Tubulinaggregation. Unter physiologischen Temperaturen waren die Tubulinstapel vor allem in Nukleusnähe zu finden (Abb. 13, unten links). Nach kombinierter Hitze/Zytostatika-Behandlung wiesen alle Zellen klumpige tubuläre Strukturen im Zytoplasma auf (Abb. 13, unten rechts).

Zusammenfassend konnte ich mittels Western blot Analysen zeigen, dass sich durch die Tubulin-interagierenden Zytostatika Paclitaxel und Vincristin die zytoplasmatische Hsp70-Expression sowohl in normalen Zellen, als auch in Tumorzellen steigern liess. Im Gegensatz dazu konnte ich mit Hilfe von Western blots und FACS-Analysen nachweisen, dass sich die Hsp70-Membranexpression auf Tumorzellen (K562), nicht aber auf Normalzellen (PBL) signifikant gesteigert liess. DNA-interagierende Zytostatika (Cytarabin, Caboplatin, Doxorubicin, Fluarabin, Ifosfamid) beeinflussten weder die zytoplasmatischen noch die Hsp70-Membranexpression in Tumorzellen oder Normalzellen.

#### **4.3 Effekte einer Bag-4-Transfektion auf die Hsp70-Expression**

Wie in der Einleitung beschrieben, ist Bag-4 unter anderem mit Hsp70 im Zytoplasma assoziiert. Zunächst untersuchte ich die Hsp70-Membranexpression auf Zellen, die Bag-4 im Zytoplasma stark überexprimierten (HeLa Bag-4). Als Kontrolle verwendete ich mit einem leeren Neo-Vektor transfizierte HeLa Zellen (HeLa neo). Die Überproduktion von Bag-4 im Zellinneren wurde mittels Western blot Analysen kontrolliert (Abb. 14).



Abb. 14: Zytoplasmatische Bag-4-Expression der Zelllinien HeLa neo und HeLa Bag-4.

Je  $10^6$  Zellen in exponentieller Wachstumsphase wurden mit PBS gewaschen und dann wurde die Zytoplasmafraktionen gewonnen. Je  $10\mu\text{g}$  Gesamtprotein wurden mit SDS-PAGE getrennt und auf eine NC-Membran transferiert. Die Proteinen wurden dann mit dem Bag-4-spezifischen Antikörper SODD H-300 und einem entsprechenden HRP-konjugierten Sekundärantikörper markiert. Die spezifischen Proteinbanden wurden mit dem ECL-Kit angefärbt. Der gezeigte Western blot ist repräsentativ für routinemäßig durchgeführte Kontrollen.

Interessanterweise zeigten die mit Bag-4 transfizierten Zellen (HeLa Bag-4) ebenfalls eine erhöhte Hsp70-Membranexpression (48,8%, Abb. 15, unten). Untransfizierte HeLa-Zellen verhielten sich wie Vektor-transfizierte HeLa neo Zellen (HeLa: 20,2%; HeLa neo 21,0%; Abb. 15 obere Reihe links und rechts).

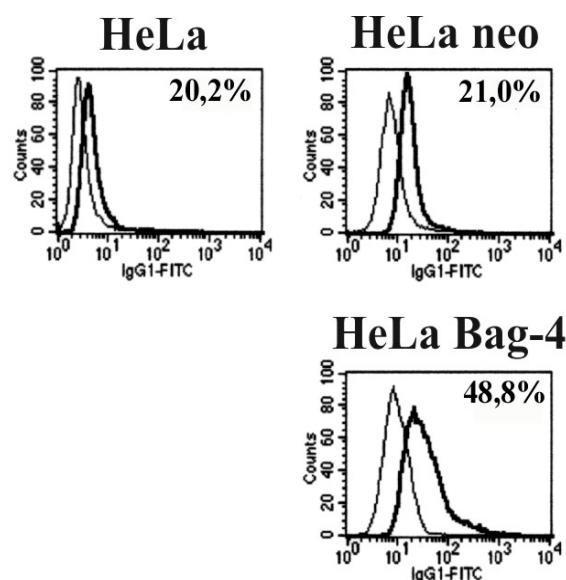


Abb. 15: Hsp70-Membranexpression der Zelllinien HeLa, HeLa neo und HeLa Bag-4.

Je 100.000 Zellen der Zelllinien wurden mit dem Hsp70-spezifischen FITC-konjugierten monoklonalen Antikörper cmHsp70.1 gefärbt und im FACS analysiert (dicke Linie). Als Kontrollen dienten mit FITC-konjugierte Isotypenkontrollen (dünne Linie). Der Prozentsatz der Hsp70-positiven Zellen ist jeweils korrigiert um den Prozentsatz an unspezifisch gefärbt Zellen der Isotypenkontrolle. Als Inlet ist jeweils dieser korrigierte Prozentsatz angegeben. Die Histogramme sind repräsentativ für routinemäßig durchgeführte FACS-Analysen.

Nachdem sichergestellt war, dass Bag-4-transfizierte HeLa Zellen im Zytoplasma Bag-4 überexprimierten, untersuchte ich im weiteren den Effekt von  $\gamma$ -Bestrahlung sowohl auf Hsp70- als auch auf die Bag-4-Expression.

## 4.4 Effekte von $\gamma$ -Bestrahlung

### 4.4.1 Definition subletaler Dosen

Durch Zellsortierung der Kolonkarzinomzelllinie CX-2 und der Pankreaskarzinomzelllinie Colo357 mit Hilfe des Hsp70-spezifischen monoklonalen Antikörpers (mcHsp70.1; siehe

Material und Methoden) wurden stabile Hsp70-hoch (CX+: >80%; Colo+: >75%) und –niedrig (CX-: <30%; Colo-: <35%) exprimierende Karzinomsubzelllinien generiert (siehe Kap. 4.1.1). Das Expressionsmuster blieb für mindestens 30 Zellpassagen konstant. Vor der Untersuchung von Effekten durch  $\gamma$ -Bestrahlung wurde die subletale Dosis bestimmt.

Tab. 2: Vitalität von Tumorzellen nach fraktionierter  $\gamma$ -Bestrahlung oder Bestrahlung in Einzeldosen.

Am Tag 2 nach dem Passagieren wurden die adhärenenten Zellen in exponentieller Wachstumsphase mit verschiedenen Dosen bestrahlt. Nach einer 24-stündigen Erholungsphase bei 37°C wurde die Vitalität der Zellen mit Trypan-Blau-Assays oder Annexin-V-Staining bestimmt. Die Daten sind die Mittelwerte an vitalen Zellen aus drei voneinander unabhängigen Experimenten. – nicht getestet; \* Werte signifikant unterschiedlich von der Kontrolle (nach Gehrmann *et al.* (2003a)).

$\gamma$ -Bestrahlung	Kontrolle	2 x 2Gy	5 x 2Gy	1 x 10Gy	1 x 20Gy
Zelllinie	Prozent vitale Zellen (Mittelwerte)				
CX+	100	100.0	97.8	96.6	95.0
CX-	100	96.6	96.0	98.6	87.5*
Colo+	100	-	-	97.0	88.9
Colo-	100	-	-	90.8	80.5*
HeLa Bag-4	100	-	-	97.7	96.7
HeLa neo	100	-	-	98.0	91.4

Zu diesem Zweck wurden die Zelllinien mit initial unterschiedlicher Hsp70-Membranexpression entweder fraktioniert (2 x 2Gy und 5 x 2Gy) oder mit den Einzeldosen von 1 x 10Gy oder 1 x 20Gy bestrahlt.

Bis zu einer Gesamtdosis von 10Gy, unabhängig ob als Einzeldosis oder fraktioniert verabreicht, wurde die Vitalität der Kolonkarzinom- und Pankreaskarzinomzelllinien nicht beeinträchtigt, wie ich durch Trypan-Blau- oder Annexin-V-Assays feststellte. Nach  $\gamma$ -Bestrahlung mit einer Dosis von 20Gy war die Vitalität der CX+ und Colo+ Zellen schwächer reduziert wie bei den Hsp70-schwach exprimierenden CX- und Colo-

Subzelllinien (Tab. 2). Die Vitalität der HeLa Zervixkarzinomzelllinien, die mit dem leeren Neo-Vektor oder Bag-4/Neo transfiziert waren, war nach Bestrahlung mit einer Dosis von 1 x 20Gy nur schwach reduziert (Tab. 2).

#### **4.4.2 Zytoplasmatische Hsp70/Bag-4-Expression**

Die Ermittlung der subletalen Dosis ergab, dass 1 x 10Gy, gefolgt von einer 24-stündigen Erholungsphase bei 37°C für alle Zelllinien keine toxische Wirkung aufwies. Obwohl sich die Karzinomsubzelllinien CX+/Cx- und Colo+/Colo- in ihrer Kapazität Hsp70 an der Oberfläche zu exprimieren signifikant unterschieden, war die Menge an zytoplasmatischem Hsp70 vor und nach  $\gamma$ -Bestrahlung identisch (Abb. 16A und 16B, oben). Es ist bekannt, dass Bag-4 an die ATPase-Domäne von Hsp70 bindet. Deshalb wurde zusätzlich zu Hsp70 die Menge an zytoplasmatischem Bag-4 in unbehandelten und  $\gamma$ -bestrahlten Kolonkarzinom- (CX+/CX-) und Pankreaskarzinom-Zelllinien (Colo+/Colo-) bestimmt. Von Pankreaskarzinomzellen ist bekannt, dass sie eine gesteigerte Bag-4-Expression aufweisen, die mit einer Resistenz gegenüber TNF-induziertem Zelltod verbunden sein kann. Meine Daten bestätigten, daß die zytoplasmatische Menge an Bag-4 in den Colo+/Colo- Pankreaskarzinomsubzelllinien (Abb. 16B, unten), bestimmt durch Densitometrie, ungefähr doppelt so hoch war wie bei den CX+/CX- Kolonkarzinomsubzelllinien (Abb. 16A, unten). Die Auftragsmenge an Gesamtprotein bei den Western blots war identisch. Eine subletale  $\gamma$ -Bestrahlung (1 x 10Gy) erhöhte die Menge an zytoplasmatischem Bag-4 in den Tumorsubzelllinien nicht. Für die Western blot Analysen wurden verschiedener Bag-4-Antikörper, die spezifisch Epitope im C- oder N-Terminus erkennen, verwendet (siehe Material und Methoden)(Abb. 16A, unten und 16B, unten). Identische Resultate konnten mit Bag-1 spezifischen Antikörpern erzielt werden (Daten nicht gezeigt).

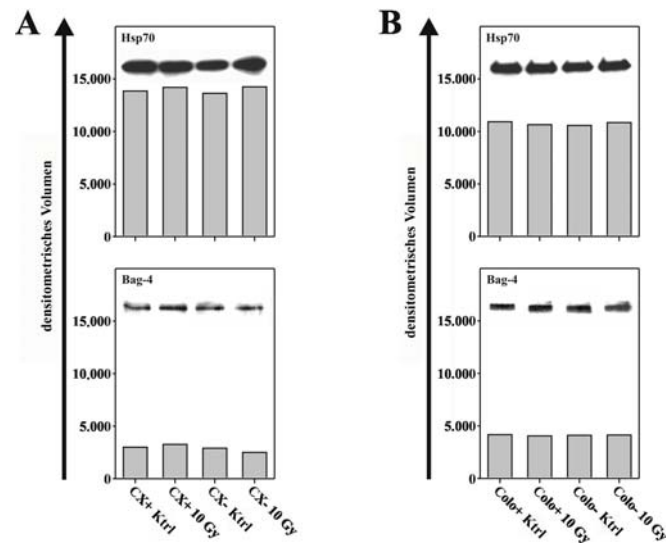


Abb. 16: Die zytoplasmatischen Hsp70 und Bag-4 Mengen bleiben in den Kolon- (CX+/CX-) und den Pankreas-Karzinomzelllinien (Colo+/Colo-) nach subletaler  $\gamma$ -Bestrahlung unverändert.

Adhärenz wachsende CX+/CX- (A) und Colo+/Colo- (B) Karzinomzelllinien blieben entweder unbehandelt (Ktrl) oder mit  $\gamma$ -Bestrahlung behandelt (10Gy). Nach einer Erholungsphase von 24h bei 37°C wurden Zelllysate hergestellt. Gleiche Proteinmengen (10 $\mu$ g) wurden in 10% Polyacrylamidgelen elektrophoretisch aufgetrennt und auf Nitrocellulosemembranen aufgetragen. Die Western blots wurden mit Hsp70- und Bag-4-spezifischen Antikörpern markiert. Die Proteinbanden wurden densitometrisch analysiert. Histogramme und Western blots sind repräsentativ für mindestens drei voneinander unabhängige Experimente (nach Gehrman *et al.* (2003a)).

Eine Untersuchung des Gehalts an Bag-1 in Tumorzellen nach subletaler  $\gamma$ -Bestrahlung ergab vergleichbare Ergebnisse.

Zusammenfassend konnte ich feststellen, dass die untersuchten Kolonkarzinom- und Pankreaskarzinomzelllinien nach subletaler  $\gamma$ -Bestrahlung keine Unterschiede in der zytoplasmatischen Hsp70- oder Bag-4 Expression aufwiesen.

Um die Frage einer coregulierten Hsp70/Bag-4-Membranexpression detaillierter zu untersuchen, wurde zunächst die zytoplasmatische Menge an Hsp70 und Bag-4 in unbehandelten und bestrahlten HeLa Zellen bestimmt, die entweder mit dem Neo-Vektor

oder Bag-4 transfiziert waren (Abb. 17). Bag-4 transfizierte Zellen enthalten deutlich mehr zytoplasmatisches Bag-4 als neo-transfizierte HeLa Zellen. Der zytoplasmatische Hsp70-Gehalt blieb von Bag-4-Überexpression unbeeinflusst (Abb. 17 oben). Nach subletaler  $\gamma$ -Bestrahlung blieben die Mengen an zytoplasmatischen Hsp70/Bag-4 unverändert (Abb. 17).

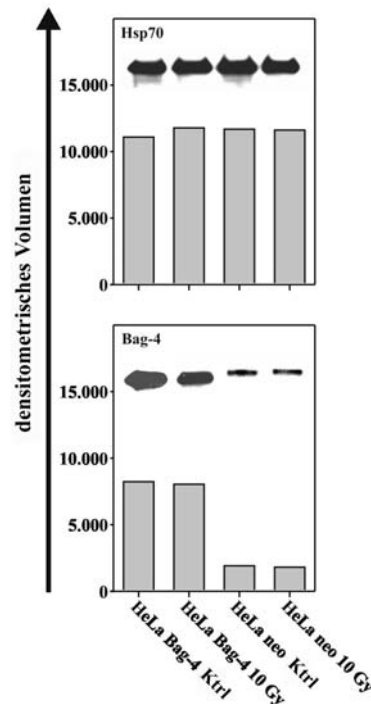


Abb. 17: Zytoplasmatisches Hsp70 oder Bag-4 verändern sich nach  $\gamma$ -Bestrahlung in Bag-4 überexprimierenden Zellen oder neo-transfizierten Zellen nicht.

HeLa Zervixkarzinomzellen, die mit dem Maushomolog von Bag-4 transfiziert wurden, wiesen eine stark erhöhte Menge an Bag-4 im Zytoplasma auf, verglichen mit neo-transfizierten oder untransfizierten Zellen (Daten nicht gezeigt). HeLa Bag-4- und neo-transfizierte Karzinomzellen blieben entweder unbehandelt oder wurden mit  $\gamma$ -Bestrahlung behandelt. Nach einer Erholungsphase von 24h wurden Zelllysate hergestellt und gleiche Proteinmengen (10 $\mu$ g) wurden elektrophoretisch aufgetrennt (10% SDS-PAGE). Nach Transfer auf Nitrocellulosemembranen wurden die Proteine mit Hsp70- und Bag-4-spezifischen Antikörpern gefärbt. Die Proteinbanden wurden densitometrisch analysiert. Die gezeigten Histogramme und Western blots sind repräsentativ für 4 voneinander unabhängige Experimente (nach Gehrmann *et al.* (2003a)).



#### 4.4.3 Hsp70/Bag-4-Membranexpression

Obwohl im Zytoplasma nach subletaler  $\gamma$ -Bestrahlung weder in der Hsp70-, noch in der Bag-4-Expression Veränderungen festgestellt werden konnten, konnten Modulation in der Hsp70-Membranexpression beobachtet werden. Wie in Abb. 18A, oben zu sehen blieb der Anteil der Hsp70-positiven Zellen CX+ Zellen nach  $\gamma$ -Bestrahlung gleichbleibend hoch (82% gegenüber 81%). In den CX- Zellen konnte jedoch ein signifikanter Anstieg an Hsp70-positiven Zellen festgestellt werden ( $p < 0,03$ ). Der Anteil an Hsp70-positiven Zellen stieg von 34% auf 59%. Interessanterweise waren die Hsp70-positiven Zellen ebenfalls stark positiv für Bag-4 (78%), wie ich mit zwei Antikörpern feststellen konnte, die die C-terminale Bag-Domäne erkennen. Ein Antikörper, der ein Epitop im N-Terminus erkennt (SODD N-19), detektierte Membran-gebundenes Bag-4 nicht (Daten nicht gezeigt). Nur 42% der Hsp70 schwach exprimierenden CX- Zellen zeigten einen Bag-4 positiven Phänotyp (Abb. 18, unten). Analog zu Hsp70 konnte nach Bestrahlung nur in CX- Zellen ein Anstieg der Bag-4 positiven Zellen (73% gegenüber 42%) identifiziert werden, nicht aber in CX+ Zellen (79% gegenüber 78%). Bezüglich der Mean Fluorescence Intensity (MFI), die ein Maß für die Proteindichte auf den Zellen darstellt, konnte ein signifikanter Anstieg an Hsp70 ( $p < 0,03$ ) und an Bag-4 ( $p < 0,05$ ) detektiert werden (Abb. 18, links). Mit Antikörpern gegen Bag-1 oder Bag-3 konnte keine positive Membranfärbung nachgewiesen werden.

Zusammenfassend konnte ich zeigen, dass  $\gamma$ -Bestrahlung Hsp70 und Bag-4 auf der Zellmembran von Karzinomsubzelllinien hochreguliert, die ursprünglich eine niedrige Expression aufwiesen.

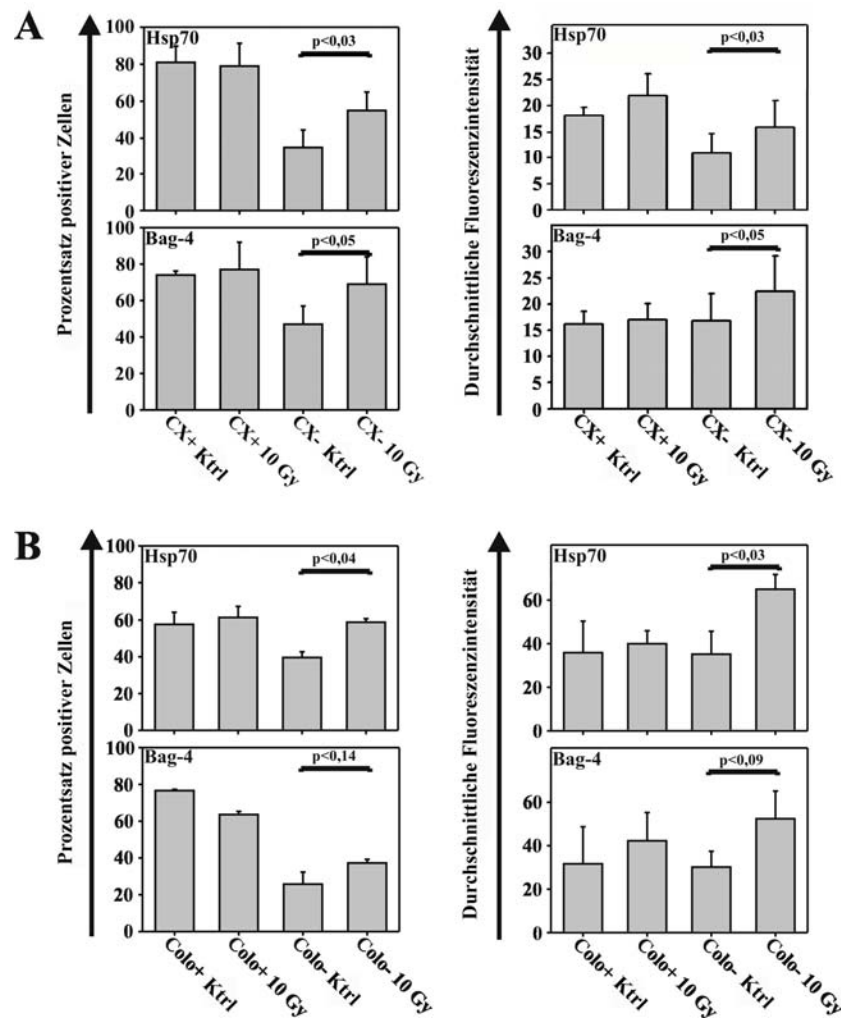


Abb. 18: Die Oberflächenexpression von Hsp70 und Bag-4 wurde nach  $\gamma$ -Bestrahlung in Hsp70 schwach exprimierenden Kolon- (CX-) und Pankreas- (Colo-) Subzelllinien hoch reguliert.

Der Prozentsatz an positiven Zellen (links) und die Mean Fluoreszenz Intensity (MFI) (rechts) der Hsp70 und Bag-4 Einfachfärbungen wurden durchzytometrisch bei unbehandelten (Ktrl) und  $\gamma$ -bestrahlten (10Gy) Kolon- (A: CX+/CX-) und Pankreas- (B: Colo+/Colo-) Karzinomzellen bestimmt. Für die Bag-4 Markierung wurde ein Antikörper verwendet dessen Epitop im C-Terminus von Bag-4 (SODD H-300) liegt. Die Histogramme sind die Mittelwerte von 5 voneinander unabhängigen Experimenten  $\pm$  SE. Unterschiede sind durch die jeweiligen p-Werte angezeigt (nach Gehrman *et al.* (2003a)).

Diese Daten konnten in dem Pankreaskarzinomzelliniesystem Colo+/Colo- bestätigt werden. Nach Zellsortierung mit dem Hsp70 spezifischen monoklonalen Antikörper

cmHsp70.1 waren ca. 60% der Colo+ einen Hsp70 positiven Phänotyp, aber nur ungefähr 37% der Colo- Zellen waren Hsp70 positiv (Abb. 18b, oben). Bezüglich Bag-4 waren 78% der Colo+ und 29% der Colo- Zellen Membran-positiv (Abb. 18B, unten). Dieser Phänotyp blieb in den Subzelllinien in den nachfolgenden Passagen stabil. Wie bereits bei den CX+/CX- Zellen gezeigt, und im Gegensatz zu den festgestellten Unterschieden in der Membranexpression waren die intrazellulären Hsp70/Bag-4 Mengen in den Colo+/Colo- Zellen identisch (Abb. 18B). Nach subletaler  $\gamma$ -Bestrahlung zeigten sich in den Colo-, nicht aber in den Colo+ Zellen ein signifikanter Anstieg ( $p<0,04$ ) an Hsp70 (37% gegenüber 58%) und Bag-4 (29% gegenüber 39%) positiven Zellen (Abb. 17b). Ebenso wie bei den CX- Zellen war die Proteindichte an Hsp70 ( $p<0,03$ ) und Bag-4 ( $p<0,04$ ) auf den Colo- Zellen nach  $\gamma$ -Bestrahlung signifikant erhöht.

Ähnliche Ergebnisse konnten im HeLa-System festgestellt werden. Im Gegensatz zum Zytoplasma konnten bezüglich der Hsp70- und der Bag-4 Membranexpression nach Bestrahlung deutliche Unterschiede festgestellt werden. Wie in Abb. 19, links gezeigt, lag der Anteil Hsp70-positiver Zellen nach Bag-4-Transfektion bei 60%, in neo-transfizierten Zellen bei 38%. Bag-4 transfizierte Zellen waren zu 78% Bag-4 positiv, neo-transfizierte Zellen zu 49%. Nach  $\gamma$ -Bestrahlung konnte ein signifikanter Anstieg der Hsp70 ( $p<0,04$ ) und der Bag-4 ( $p<0,001$ ) positiven Zellen in den Vektor-transfizierten Kontrollzellen festgestellt werden (Hsp70: 38% auf 58%; Bag-4: 49% auf 76%). Wie schon für das CX- und Colo- Zellesystem gezeigt, stieg zusammen mit den positiven Zellen auch die MFI von Hsp70 ( $p<0,03$ ) und Bag-4 ( $p<0,09$ ) (Abb. 19, rechts).

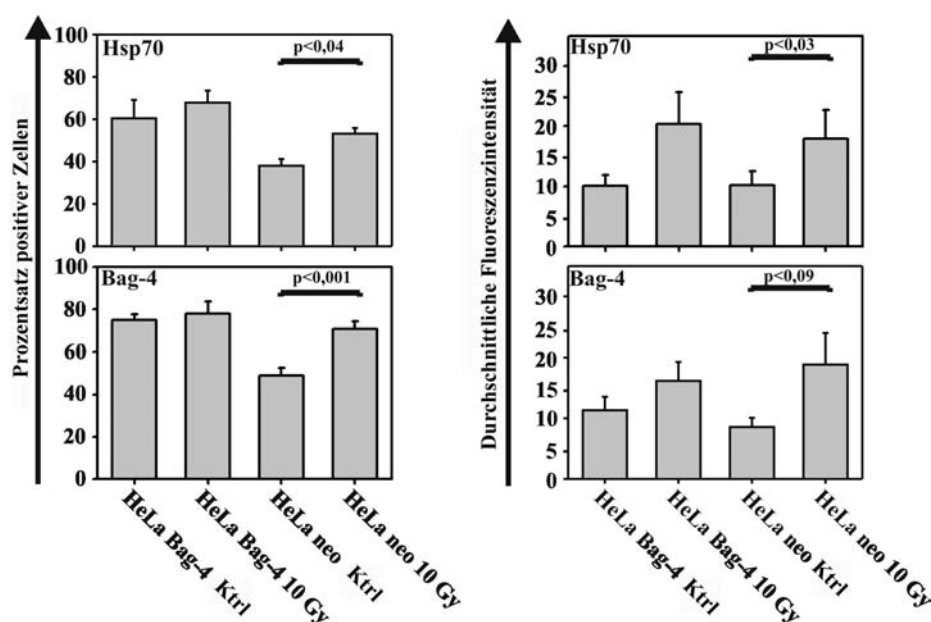


Abb. 19: Die Oberflächenexpression von Hsp70 und Bag-4 wurde in neo-transfizierten HeLa-Zellen nach  $\gamma$ -Bestrahlung hochreguliert.

Der Prozentsatz an positiven Zellen (jeweils links) und die Mean Fluorescence Intensity (MFI) (jeweils rechts) von Hsp70- und Bag-4-Einzelfärbungen wurden durchflußzytometrisch bei unbehandelten (Ktrl) oder  $\gamma$ -bestrahlten (10Gy) HeLa Bag-4/HeLa neo transfizierten Karzinomzellen bestimmt. Für die Bag-4-Markierung wurde ein Antikörper verwendet, dessen Epitop in der C-terminalen BAG-Domäne liegt. Die Histogramme sind aus den Daten von 5 voneinander unabhängigen Experimenten  $\pm$  SE. Unterschiede sind durch die jeweiligen p-Werte dargestellt (nach Gehrmann *et al.* (2003a)).

Zusammengefasst reagierten neo-transfizierte und nicht-transfizierte HeLa Zellen wie CX- und Colo- Zellen nach Bestrahlung mit einem signifikanten Anstieg an Hsp70/Bag-4-positiven Zellen und einer höheren Proteindichte der beiden Moleküle auf der Zelloberfläche. Bag-4 überexprimierende HeLa Zellen verhielten sich ähnlich wie CX+ oder Colo+ Zellen. Der Anteil an positiv gefärbten Zellen blieb nach Bestrahlung unverändert hoch.

Nun galt es die Frage zu klären, ob Hsp70 und Bag-4 auf der Membran colokalisiert sind.

## 4.5 Interaktionspartner von Hsp70 auf der Zellmembran

### 4.5.1 Colokalisierung von Hsp70 und Bag-4

Um nachzuweisen, dass Hsp70 und Bag-4 auf der Zelloberfläche gemeinsam vorkommen, wurden durchflusszytometrische Analysen mit Hsp70-FITC und Bag-4/PE Antikörpern durchgeführt. In Abb. 20A-20C, markieren horizontale und vertikale Linien die Resultate

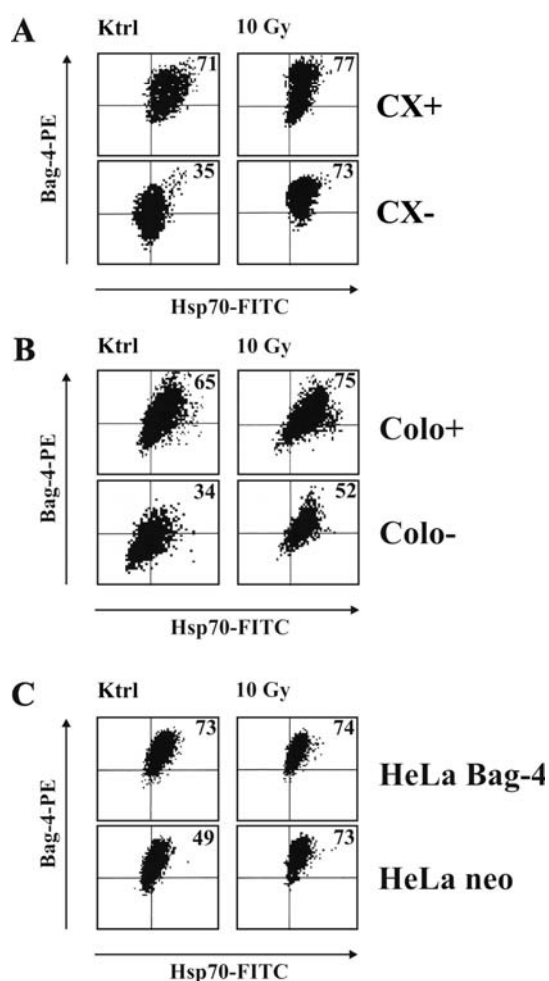


Abb. 20: Nach  $\gamma$ -Bestrahlung wird die Hsp70/Bag-4 doppelt positive Zellpopulation in Hsp70/Bag-4 schwach exprimierenden Karzinomzelllinien vermehrt.

Die Karzinomsubzelllinien CX+/Cx- (A), Colo+/Colo- (B) und HeLa Bag-4/HeLa neo (C) wurden mit Hsp70-FITC und Bag-4-PE doppelt angefärbt und mittels Multiparameter-Durchflusssytmetrie analysiert. Die Werte stellen jeweils den Prozentsatz an doppelt-positiv gefärbten Zellen dar, korrigiert um die Werte von mit Isotypen markierten Kontrollzellen. Nur 7-AAD-negative, vitale Zellen wurden gated. Die Dot blots zeigen ein repräsentativ Markierungsmuster von drei identischen Experimenten, die Durchschnittswerte der für Hsp70/Bag-4 doppelt gefärbten Zellen ist jeweils in der rechten oberen Ecke angegeben (nach Gehrman *et al.* (2003a)).

aus Färbung mit Isotypenkontrollantikörpern. Unter physiologischen Bedingungen war eine dominante Hsp70/Bag-4 doppelte-positive Zellpopulation, im oberen rechten Quadranten, nur bei CX+, Colo+ und Bag-4 transfizierten HeLa-Zellen vorhanden.

Nach subletaler  $\gamma$ -Bestrahlung stieg diese Population in CX+ (Abb. 20A: 71% zu 72%), Colo+ (Abb. 20B: 65% zu 75%) und in Bag-4 transfizierten HeLa Zellen (Abb. 20C: 73% zu 74%) nicht signifikant an. Im Gegensatz dazu war die Anzahl der ursprünglich schwach

doppelt-positiven CX- (Abb. 20A: 35% zu 73%), Colo- (Abb. 20B: 34% zu 52%) und neo-transfizierten HeLa Zellen (Abb. 20C: 49% zu 73%) stark erhöht, wie an dem Shift der Zellpopulationen von der linken unteren zur oberen rechten Ecke erkennbar wird. Diese Daten, die die Resultate der Abb. 16 - 19 mit Einzelantikörperfärbungen stützen zeigen, dass die gleichen Zellen beide Proteine, Hsp70 und Bag-4, auf ihrer Zelloberfläche exprimieren.

Um die Hypothese zu untersuchen, dass Hsp70 und Bag-4 auf der Zelloberfläche colokalisiert sind, untersuchte ich immunzytochemisch Hsp70/Bag-4-doppelt-positive CX+ Zellen mittels Zweifarbentechnik. Abb. 21A zeigt Bag-4-PE Einfachfärbung in rot und Abb. 21B Hsp70-FITC Einfachfärbung in grün. Eine gelbe Färbung entstand durch die Überlagerung von beiden Immunmarkierungen und zeigte, dass Hsp70 und Bag-4 Moleküle an der Zelloberfläche colokalisiert sind (Abb. 21c). Lichtmikroskopische Analysen (Abb. 21D) zeigten, dass die untersuchten Zellen eine normale Morphologie aufweisen. In den Abb. 21D-H sind die jeweiligen Isotypenkontrollen jeder Färbung gezeigt. Abb. 21I zeigt eine Hsp70/Bag-4 Doppelfärbung bei stärkerer Vergrößerung (40x). Die colokalisation ist erkennbar durch ein Vielzahl gelbe Punkte auf der Zellmembran. Eine lichtmikroskopische Aufnahme dieser Zellen ist in Abb. 21J zu sehen. Ähnliche Resultate wurden mit Colo+ und Bag-4 transfizierten HeLa Zellen erzielt (Daten nicht gezeigt).

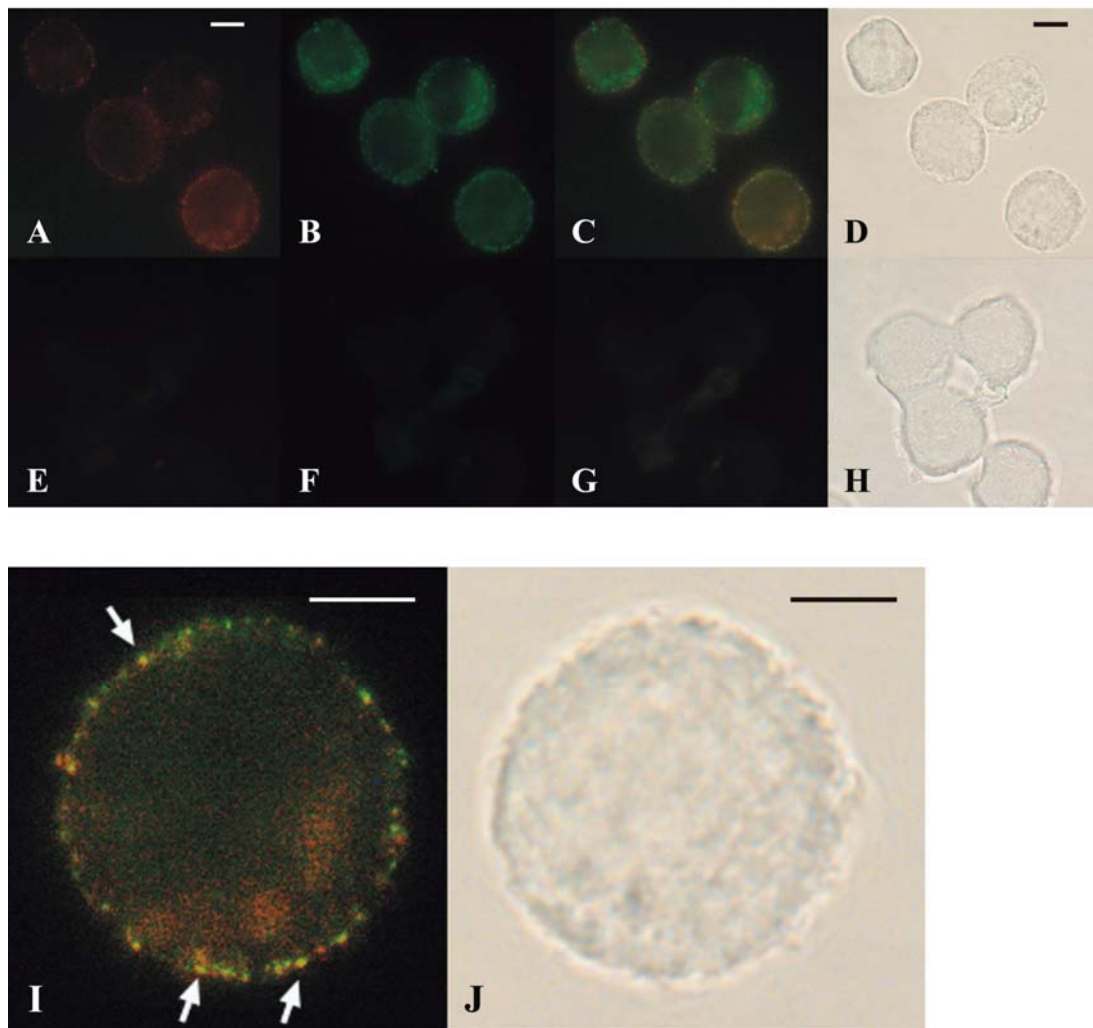


Abb.21: Hsp70 und Bag-4 sind auf der Oberfläche von Karzinomzellen colokalisiert.

CX+ Zellen wurden bei 4°C mit Bag-4-PE (A) und dem Hsp70 FITC-konjugierten (B) Antikörper oder mit den jeweiligen Isotypen (E,F) markiert. Die Zellen wurden eingedeckelt und in einem Fluoreszenzmikroskop analysiert. Bag-4 positive Zellen sind in rot sichtbar, Hsp70 positive markierte Zellen in grün; Colokalisierung ist als Überlagerung von rot und grün in Gelb sichtbar (z.B. Pfeile). Bild I zeigt in stärkerer Vergrößerung eine doppelt-positive Tumorzelle. Die entsprechenden lichtmikroskopischen Aufnahmen sind in den Fotos D, H und J gezeigt. Maßstab: 10µM.

Ich konnte somit zeigen, dass Hsp70 und Bag-4 nach  $\gamma$ -Bestrahlung gemeinsam auf der Zellmembran verstärkt exprimiert wurden und colokalisiert waren.

#### 4.5.2 Hsp70/Bag-4 in Caveolae

Caveolae sind Strukturen in der äußeren Zellmembran, die als Merkmale hohe Cholesterol- und Sphingolipid-Gehalte aufweisen und bestimmte Marker wie zum Beispiel Caveolin-1 (Smart *et al.*, 1994) enthalten. Für zellbiologische Untersuchungen ist besonders interessant, dass Caveolae aufgrund ihrer Lipid-Zusammensetzung im Gegensatz zur übrigen Plasmamembran ein relativ geringes

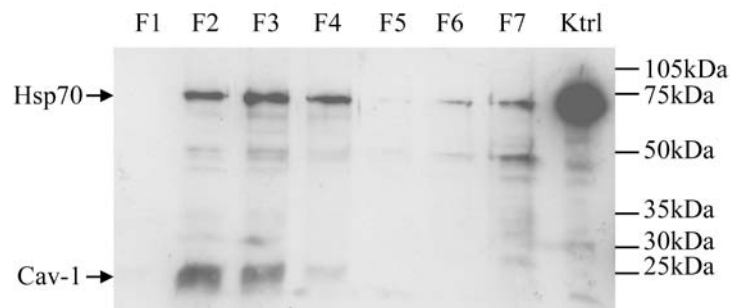


Abb. 22: In Caveolae von Colo+ Zellen kommen Hsp70 und Caveolin-1 in der gleichen Fraktion vor.

Zellmembranfraktionen von Colo+ wurden mittels eines Saccharosegradienten in der Ultrazentrifuge aufgetrennt. Von den einzelnen Fraktionen wurden je 30 $\mu$ l mittels SDS-PAGE und Western blot auf NC-Membranen übertragen und mit Hsp70 und Caveolin-1 spezifischen Antikörpern gefärbt. Ktrl Kontrolle, F Fraktion, Cav-1 Caveolin 1.

spezifisches Gewicht haben. Rafts wurden von mir aus Plasmamembranextrakten von CX+, CX-, Colo+, Colo+, HeLa Bag-4 und HeLa neo Zellen mit Hilfe eines Saccharosegradienten in einer Ultrazentrifuge generiert. Beispielhaft sind hier die Daten von Colo+ Zellen gezeigt. Die Hauptmenge der isolierten Proteine fanden sich in den Fraktionen F8, F9 und F10 (Daten nicht gezeigt).



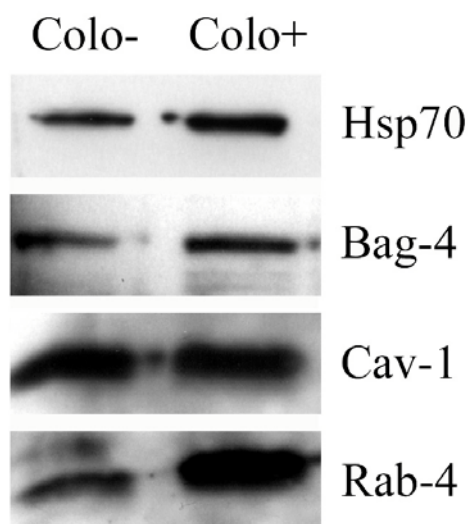


Abb. 23: Lokalisierung einiger Proteine in Caveolae.

Plasmamembranfraktionen wurden in abgestuften Gradienten von 0,1M, 0,7M, 0,8M, 0,9M und 1,2M Saccharose aufgetrennt. Gleiche Mengen (30µl) der Fraktion F2 wurden elektrophoretisch aufgetrennt und auf Nitrozellulosemembran übertragen. Die Proteinen wurden mit spezifischen Antikörpern und entsprechenden HRP-konjugierten Sekundärantikörpern markiert.

Das Markerprotein Caveolin-1 war gemeinsam mit Hsp70 in den Fraktionen F2 - F4 nachweisbar. In den identischen Fraktionen lassen sich außerdem noch das Hsp70-assoziierte Protein Bag-4 und die GTPase Rab-4 detektieren (Abb. 23).

Rab-4 ist beschrieben worden als ein kleines GTP-bindendes Protein, das mit dem endozytotischem Recycling und der Sortierung und dem Transport von Proteinen vom Zytoplasma in die Membran in Verbindung gebracht wird. Andere vesikuläre Marker, wie z.B. Rab-7, Rab-9 und Rab-11 konnten in diesen Fraktionen nicht detektiert werden. Die Funktion dieser unterschiedlichen GTPasen ist in nachfolgender Tabelle 3 dargestellt.

Tab. 3: Lokalisierung und Funktionen der untersuchten Rab-Proteine

Protein	Lokalisierung	Mögliche Funktion
Rab-4	EE, RE, PM	EE-PM sorting/recycling
Rab-7	LE	EE-LE, LE-Lysosomen
Rab-9	LE, TGN	LE-TGN Transport
Rab-11	RE, TGN, PM	endozytotisches Recycling

Abk.: EE early endosomes, RE recycling endosomes, PM plasma membrane, LE late endosomes, TGN trans-Golgi network (Tabelle nach Pereira-Leal und Seabra (2001), Segev (2001) und Seabra *et al.* (2002)).

Zusammenfassend konnte ich zeigen, dass Hsp70 und Bag-4 auf der Zelloberfläche exprimiert werden und colokalisiert sind. Weiterhin konnte von mir ein Zusammenhang zwischen der Hsp70/Bag-4-Membranexpression und dem Vorhandensein von Caveolin-1 hergestellt werden. Weitere Untersuchungen sollten nun klären, welche funktionellen Konsequenzen die Hsp70/Bag-4-Membranexpression haben könnte.

## **4.6 Funktionelle Aspekte von Membran-gebundenem Hsp70 auf Tumorzellen**

### **4.6.1 Protektion gegen Bestrahlung**

Um die Folgen einer  $\gamma$ -Bestrahlung in Tumorsubzelllinien mit unterschiedlicher Hsp70/Bag-4 Membranexpression zu untersuchen, wurden die unterschiedlichen Subzelllinien (CX+/-, Colo+/-, HeLa neo/Bag-4) einem Proliferationstest unterzogen. Nach  $^3\text{H}$ -Thymidin-Markierung wurden die Zellen in 96well Platten ausgesät. Nach einer Inkubationszeit von 48h wurden mikroskopische Aufnahmen der Zellen in Kultur gemacht. Unbehandelt war das Wachstum der Hsp70/Bag-4 hoch exprimierenden Zellen (CX+, Colo+ und HeLa Bag-4) vergleichbar zu dem der Hsp70/Bag-4 schwach exprimierenden Zellen (CX-, Colo- und HeLa neo) (Histogramme und Fotos in Abb. 24 A-C).

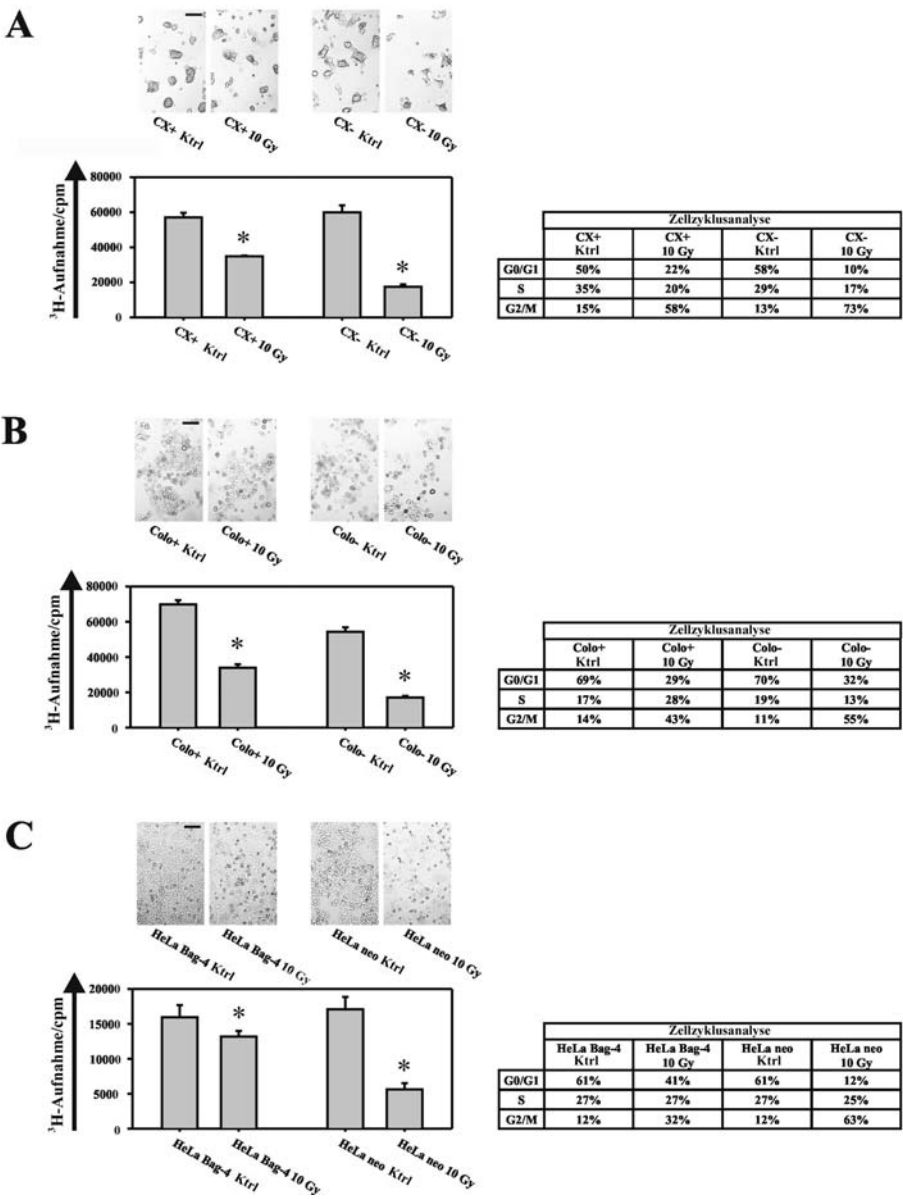


Abb. 24: Karzinomzelllinien mit schwacher Hsp70/Bag-4-Expression reagieren sensitiver auf  $\gamma$ -Bestrahlung als ihre Hsp70/Bag-4 stark exprimierenden Korrelate.

Gezeigt sind lichtmikroskopische Aufnahmen der Zellen in Kultur,  $^3\text{H}$ -Thymidin Aufnahme und Zellzyklusanalyse von unbehandelten (Ktrl) oder  $\gamma$ -bestrahlten (10Gy) CX+/CX- (A), Colo+/Colo- (B) und HeLa Bag-4/HeLa neo (C) Zellen. Die Inhibition des Zellwachstums und der G2/M Zellzyklusstop waren signifikanter (\*,  $p < 0,05$ ) ausgeprägt in den Hsp70/Bag-4 schwach exprimierenden Karzinomzelllinien, verglichen mit ihren Hsp70/Bag-4 stark exprimierenden Korrelate. Maßstab: 200 $\mu\text{M}$  (nach Gehrmann *et al.* (2003a))

Nach  $\gamma$ -Bestrahlung war die Proliferationsfähigkeit in allen Zellen reduziert. Die Hsp70/Bag-4 schwach exprimierenden Zelltypen (CX-, Colo-, HeLa neo) erwiesen sich als wesentlich strahlensensitiver als ihre korrespondierenden Hsp70/Bag-4 stark exprimierenden Partnerzelllinien (CX+, Colo+, HeLa Bag-4)(jeweils Histogramme in Abb. 24 A-C). Es ist bekannt, dass strahlungsinduzierte Effekte auf einen G2/M Zellzyklusstop zurückzuführen sind. Deshalb wurde zusätzlich zum  $^3\text{H}$ -Assay nach Bestrahlung eine Zellzyklusanalyse durchgeführt. Der typische G2/M-Arrest war in den Hsp70/Bag-4 schwach exprimierenden Zellen (CX-: 73% gegen 58%; Colo-: 55% gegen 43%; HeLa neo: 63% gegen 32%) signifikant stärker ausgeprägt als in den Hsp70/Bag-4 stark exprimierenden Zellen (Tabellen in Abb. 24 A-C).

Nachdem ich zeigen konnte, dass eine hohe Hsp70/Bag-4-Membranexpression eine strahleninduzierte Proliferationshemmung verringern konnte, wollte ich wissen, wie sich bestrahlte Zellen gegenüber der Lyse von NK-Zellen verhalten.

#### **4.6.2 $\gamma$ -bestrahlte Tumorzellen als Ziel für Hsp70-aktivierte NK-Zellen**

Kürzlich konnte unsere Arbeitsgruppe zeigen, dass Membran-gebundenes Hsp70 eine Zielstruktur für Hsp70-Peptid aktivierte NK-Zellen darstellt. Nach physikalischem (Hitze) oder chemischem (ET-18-OCH<sub>13</sub>, Paclitaxel, Vincristin) Stress kann die Menge an Membran-gebundenem Hsp70 gesteigert werden. Dies ist verbunden mit einer gesteigerten Sensitivität der Tumorzellen gegen die Lyse durch Hsp70-Peptid aktivierte NK-Zellen, die in einem Standard  $^{51}\text{Cr}$ -Freisetzungssassay analysierte wurde. In den folgenden Experimenten wurden Hsp70-Peptid aktivierte, über CD94 angereicherte NK-Zellen (Gross *et al.*, 2003a) als Effektorzellen verwendet, als Zielzellen wurden unbestrahlte und bestrahlte Tumorzellen eingesetzt. Wie in Abb. 25 gezeigt, wurden unbehandelte Karzinomzelllinien mit schwacher Hsp70/Bag-4 Membranexpression schlechter lysiert als ihre stark positiven Partnerzelllinien (Abb. 25, gefüllte Kreise). Nach subletaler Bestrahlung blieb die Lyse von Hsp70/Bag-4 hoch exprimierenden Zellen (CX+, Colo+, HeLa Bag-4) weiterhin hoch (Abb. 25, offene Kreise, jeweils links). Der Anteil von Hsp70/Bag-4 schwach exprimierenden Zellen stieg nach Bestrahlung signifikant stark an (Abb. 25, offene Kreise, jeweils rechts).

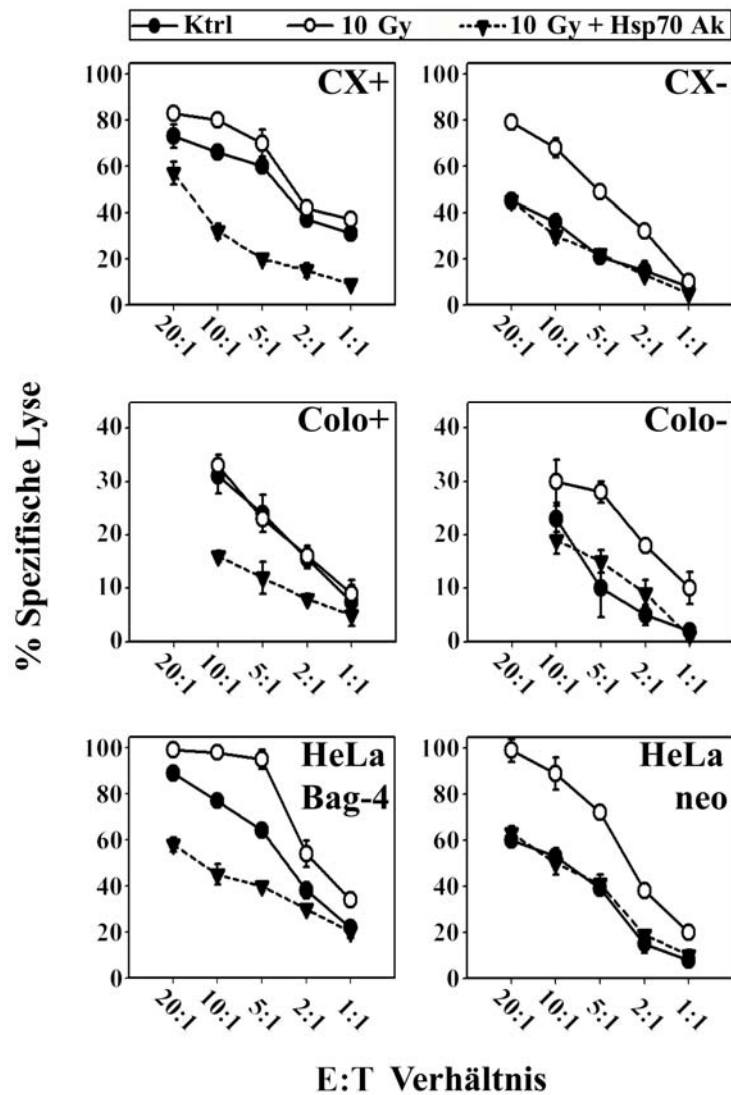


Abb. 25: Vergleich der Lyse von verschiedenen Tumoren durch aktivierte über CD94 angereicherte NK-Zellen.

NK-Zellen wurden über den Oberflächenmarker CD94 angereichert und mit dem Hsp70-Peptid TKD stimuliert. Die Tumorzellen wurden mit subletaler Dosis von 1 x 10Gy bestrahlt und danach für 24h bei 37°C inkubiert. Die zytolytische Aktivität wurde bestimmt bei Effektor zu Target-Verhältnissen im Bereich von 20:1 bis 1:1. Für Blockierungsexperimente wurden die Zellen direkt nach der  $^{51}\text{Cr}$ -Markierung mit dem Hsp70-spezifischen monoklonalen Antikörper (cmHsp70.1, siehe Material und Methoden) für 15min inkubiert. Der Prozentsatz an Spontanrelease der Targetzellen lag unter 25%. Die Daten sind die Mittelwerte aus drei voneinander unabhängigen Experimenten  $\pm$  SE (nach Gehrmann *et al.* (2003a)).

Dies zeigte, dass der bestrahlungsinduzierte Anstieg der Hsp70/Bag-4-Membranexpression die Tumorzellen sensitiver gegenüber der durch NK-Zellen vermittelten Lyse macht, obgleich sie gegen strahleninduzierte Effekte besser geschützt sind.

Hsp70-Antikörper-Blockierungsexperiment zeigten, dass die gesteigerte Hsp70-Membranexpression für die gesteigerte Lyse durch NK Zellen verantwortlich ist (Abb. 25).

Zusammenfassend läßt sich feststellen, dass eine hohe Hsp70/Bag-4 Membranexpression zur Resistenz gegen  $\gamma$ -Bestrahlung beiträgt. Andererseits konnte ich zeigen, dass eine initial oder Bestrahlungs-induziert hohe Hsp70/Bag-4 Expression mit einer gesteigerten Sensitivität gegenüber Lyse durch NK-Zellen korrespondiert.

## 5 Diskussion

### 5.1 Hsp70 - ein Tumormarker

Hitzeschockproteine erfüllen als molekulare Chaperone im Zytoplasma eine Reihe von lebenswichtigen Aufgaben bei der Proteinfaltung, Proteindisaggregation und Antigenprozessierung (Hartl und Hayer-Hartl, 2002; Castellino *et al.*, 2000). In jüngster Zeit wurde die enorme immunologische Bedeutung Membran-gebundener und extrazellulärer HSP mit Molekulargewichten von 70 und 90 kDa erkannt. Hsp70 ein soweit bekannt zytoplasmatisches Protein wird auf der Zellmembran von einer Reihe von unterschiedlichen Tumorzellen exprimiert (Multhoff *et al.*, 1995b; Ferrarini *et al.*, 1992; Shin *et al.*, 2003). Der Nachweis dieser ungewöhnlichen Zellmembranexpression gelang mittels immunologischer (Durchflusszytometrie) und biochemischer (selektiver Oberflächen Proteomics) Methoden. Ich habe verschiedene Tumorzelllinien hinsichtlich ihrer Hsp70-Membranexpression untersucht. In Übereinstimmung mit bereits publizierten Daten unserer Arbeitsgruppe konnte ich eine Hsp70-Positivität der Zelllinien Colo357 und CX2 bestätigen. Über Antikörper-vermittelte Zellsortierung konnten bereits für das Colo-System beschrieben zwei Pankreaskarzinomsubzelllinien generiert werden, die stabil eine starke und eine schwache Hsp70-Expression aufwiesen. Es gelang mir, auf der Zellen der myelogenen Leukämiezelllinie K562 eine Hsp70-Oberflächenexpression mit Hilfe von FACS-Analysen nachzuweisen. Weiterhin untersuchte ich den Einfluß einer Transfektion von Bag-4 auf die Membranexpression in HeLa-Zellen. HeLa und HeLa neo Zellen weisen eine schwache Hsp70-Positivität auf. Bag-4 überexprimierende Zellen zeigen eine deutlich verstärkte Hsp70-Membranexpression.

Neben den Tumorzelllinien wurden Tumore, Metastasen und Normalgewebe von Tumorpatienten hinsichtlich der Hsp70-Membranexpression untersucht. Dieses Tumorscreening wird in unserem Labor kontinuierlich fortgesetzt um signifikante Fallzahlen zu erzielen. Meine Ergebnisse weisen darauf hin, dass insbesondere bei kolorektalen Karzinomen, Mammakarzinomen, Pankreaskarzinomen, sowie bei verschiedenen chronischen und akuten Leukämien eine Hsp70-Membranexpression aufweisen. Auf dem korrespondierenden Normalgewebe sowie in Blutproben gesunder Spender konnte Hsp70 nicht auf der Oberfläche detektiert werden. Um sicherzustellen, dass Hsp70 auch tatsächlich auf Tumorzellen, nicht aber auf Normalgewebe exprimiert

wird, wurden zusätzliche Zelloberflächenmarker bestimmt. Bei den von mir auch untersuchten Melanomen wurde eine Korrelation mit den Melanom-assoziierten Markern Mel-1, Mel-2 und Mel-5 untersucht. Fast alle der untersuchten Melanome waren für die Mel-1 und Mel-5-positiv. Aus diesem Grund waren diese Marker für eine Differenzierung nicht geeignet. Bemerkenswerterweise zeigte sich eine vollständige Assoziation der Hsp70-Membranexpression mit einem Mel-5-negativen Phänotyp. Umgekehrt waren Mel-5-positive Melanome immer Hsp70-negativ. Nachdem Mel-5-Negativität besonders ein Merkmal für schlecht therapierbaren Melanomen ist, lag der Schluß nahe, dass genauso Hsp70-Positivität als Hinweis für eine schlechte Prognose dienen könnte. Eine Korrelation der Karyotyp-Analyse von AML-Patienten mit schlechter Prognose mit einem Hsp70 positiven Phänotyp unterstützen diese Hypothese (Gehrmann *et al.*, 2003b). Diese Daten unterstreichen die Hypothese, dass die Hsp70-Membranexpression einen prognostischen Marker für ein aggressives Tumorwachstum darstellen könnte.

## **5.2 Modulation der Hsp70-Expression**

In der vorliegenden Studie untersuchte ich Effekte einiger häufig verwendeter Zytostatika hinsichtlich ihrer Fähigkeit, die Hsp70-Expression zu induzieren. Zum einen werden erhöhte zytoplasmatische Hsp70-Mengen für anti-apoptotische Mechanismen verantwortlich gemacht, d.h. Hsp70 erlaubt es der Zelle Apoptose, induziert durch Stresseinflüsse wie Hitzeschock, Tumornekrosefaktor, oxidativem Stress, Zytostatika oder Bestrahlung zu entkommen. Zum anderen induziert extrazelluläres lokalisiertes Hsp70 eine starke Immunantwort. Membrangebundenes Hsp70 wurde von unserer Arbeitsgruppe als tumorselektive Erkennungsstruktur für NK-Zellen definiert. Eine Stress-induzierte Erhöhung der Hsp70-Membranexpression macht Tumorzellen sensibler für Lyse durch den Angriff von NK-Zellen. Aufgrund dieser unterschiedlichen Funktionen von zytoplasmatischem und membranständigem Hsp70 ist es notwendig, Effekte antineoplastische Reagenzien nicht nur hinsichtlich der Menge, sondern hinsichtlich ihrer der subzellulären Lokalisierung von Hsp70 zu untersuchen.

Gegliedert nach ihrem Wirkungsprinzip können die verwendeten Zytostatika in zwei Klassen eingeteilt werden. Carboplatin, Cytarabin, Ifosfamid, Doxorubicin und Fludarabin wirken vor allem auf die DNA, sie induzieren intra- und inter-Strang Crosslinks, DNA-



Brüche, Generieren DNA Addukte und beeinflussen DNA-assozierte Prozesse (Zalupski und Baker, 1988; Grant, 1998; Johnson, 2000; de Beer *et al.*, 2001). Die Wirkstoffe Vincristin und Paclitaxel hingegen interagieren mit Tubulin. Vincristin agiert als Spindelgift während der Mitose und verursacht so eine Tubulinaggregation (Gidding *et al.*, 1999). Durch Bindung an Mikrotubuli blockiert Paclitaxel die Mitose, was wiederum zu einer Fehlverteilung der Chromosomen führt. Mikromolare Konzentrationen von Paclitaxel führen zu einer Tubulinbündelung. Dieser Befund wird von meinen Daten bestätigt: eine nicht-letale Konzentration (1  $\mu$ M) induziert Tubulinaggregation. Unter identischer Konzentration erzeugt Vincristin ähnliche Effekte. Neben Hitze ist bekannt, dass Proteinaggregation die Synthese von Hsp70 induzieren kann. Deshalb lag der Schluß nahe, dass die Tubulinaggregate für einen Anstieg der Hsp70-Synthese im Zytoplasma verantwortlich gemacht werden können. Zusammen mit dem Befund, dass DNA-interagierende Reagenzien in nicht-letaler Dosis die Hsp70-Synthese nicht induzieren, wurde die Tubulinverteilung von mir vor und nach Behandlung untersucht. In der Tat konnten DNA-interagierende Zytostatika keine Tubulin-Aggregation induzieren.

Im weiteren beschäftigte ich mich mit der Frage, ob ein Anstieg des zytoplasmatischen Hsp70 mit einer gesteigerten Membranexpression von Hsp70 korreliert. Unsere Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass nicht-letale Hitze und nicht-toxische Konzentrationen des Alkylphospholipids ET-18-OCH<sub>3</sub> einen Anstieg von Membran-gebundenem Hsp70 auf K562 Zellen, nicht aber auf normalen Zellen induzieren (Botzler *et al.*, 1999). Wie bereits erwähnt ist die Menge an Membran-gebundenem Hsp70 assoziiert mit einer gesteigerten Sensitivität gegenüber der lytischen Aktivität von NK-Zellen (Multhoff *et al.*, 1997; Multhoff *et al.*, 1999). Die klinische Relevanz der Daten wurde durch den Befund erhärtet, dass Hsp70 nicht nur auf Tumorzelllinien, sondern auch auf frisch isoliertem Biopsie-Material von Patienten mit Karzinomen und Leukämien gefunden wurde (Hantschel *et al.*, 2000; Gehrman *et al.*, 2003b).

Meine Untersuchungen ergaben, dass eine Inkubation der myeloischen Leukämiezelllinie K562 mit nicht-toxischen Dosen von Vincristin oder Paclitaxel nicht nur die Menge an zytoplasmatischen, sondern auch die an Membran-gebundenem Hsp70 erhöht. Im Gegensatz dazu beeinflussen DNA-interagierende Zytostatika weder die Menge an zytoplasmatischem noch Membran-gebundenem Hsp70.

Es ist wichtig festzuhalten, dass die Hsp70-Membranlokalisierung auf Tumorzellen beschränkt ist. PBL gesunder Spender zeigen keine Hsp70-Membranlokalisierung, weder unter physiologischen Bedingungen, noch unter verschiedenen Stressfaktoren (Multhoff *et al.*, 1995b).

In meiner Arbeit konnte ich zeigen, dass die Behandlung von PBL gesunder Spender mit Tubulin-interagierenden Zytostatika zwar die Mengen an zytoplasmatischem Hsp70 steigern, aber nicht eine Hsp70-Membranexpression induzieren. Dies läßt die Hypothese zu, dass nicht die Induzierbarkeit der Synthese, sondern die Hsp70-Membranlokalisierung einen Tumor-spezifischen Vorgang darstellt. Die immunologischen Konsequenzen einer gesteigerten Hsp70-Membranexpression konnten an humanen Kolonkarzinomzellen und an Leukämie-Zellen gezeigt werden. In Übereinstimmung mit vorher veröffentlichten Daten von hitzegeschockten oder mit ET-18-CH3 behandelten K562-Zellen (Botzler *et al.*, 1999) konnte die Lyse durch NK- Zellen signifikant erhöht werden, wenn die Tumorzellen mit nicht-toxischen Konzentrationen von Paclitaxel inkubiert wurden und dadurch eine verstärkte Hsp70-Membranexpression aufwiesen.

Neben Zytostatika hatte ich mich auch für die Effekte physikalischer Therapie, der Radiotherapie, auf die Hsp70-Expression interessiert. Bestrahlung wird in der Krebstherapie häufig verwendet, entweder als Einzeltherapie oder in Kombination mit zytostatischen Medikamenten, bezeichnet als Radiochemotherapie. Bestrahlungsresistente Tumorklone jedoch begrenzen den therapeutischen Effekt. Starke Hsp70-Expression im Zytoplasma schützt Tumorzellen vor apoptotischem Zelltod, der durch Stressstimuli oder exogene Komponenten induziert werden kann (Jaattela, 1999). Hier analysierte ich die Effekte subletaler  $\gamma$ -Bestrahlung in drei von einander unabhängigen Karzinomzellliniensystem mit unterschiedlichem Hsp70-Expressionsmuster.

### **5.3 Interaktionspartner von Hsp70 auf der Membran**

Neben Hsp70 sind auch Mitglieder der BAG-Familie an der Regulierung von Apoptosemechanismen beteiligt. Im Menschen konnten bisher sechs BAG-Familienmitglieder identifiziert werden, die eine konservierte BAG-Domäne haben und einen variablen N-Terminus. Vier von den sechs BAG-Proteinen binden an die ATPase-Domäne von Hsp70 und Hsc70 (Takayama *et al.*, 1999). Außerdem interagieren BAG-

Proteine mit verschiedenen Oberflächenrezeptoren. Die Bag-1M Isoform interagiert mit Hsp70/Hsc70 zusammen mit Retinsäurerezeptoren, Glucocorticoid-, Östrogen- und Thyroidhormon-Rezeptoren (Takayama und Reed, 2001; Takayama *et al.*, 1995; Takayama *et al.*, 1997; Liu *et al.*, 1998; Kanelakis *et al.*, 1999), und verbinden stressabhängige Signalwege die Raf-1/ERK oder die Proliferation regulieren (Song *et al.*, 2001). Bag-3 bildet mit Phospholipase C- $\gamma$  und Hsp70/Hsc70 in Melanomzellen einen ternären Komplex und verbindet so membranabhängige Signalkaskaden mit dem Hsp70/Hsc70-Chaperonsystem (Doong *et al.*, 2000). Das zunächst in *Xenopus* identifizierte Bag-6 interagiert mit dem Apoptose-induzierenden Faktor *reaper* in *Drosophila*-Zellen (Thress *et al.*, 2001). Diese Interaktionen weisen auf einen Zusammenhang zwischen an der Plasmamembran lokalisierten Rezeptoren, Hsp70 und BAG-Proteinen hin. Es ist anzunehmen, dass nach Stress Hsp70 und unter physiologischen Bedingungen Hsc70 als Regulatoren agieren, die BAG-Proteine mit an der Plasmamembran lokalisierten Rezeptoren funktionell verbinden. Die Plasmamembran ist eine komplexe und multifunktionelle Struktur, die die interzelluläre Kommunikation von zytoplasmatischen Proteinen und Rezeptoren reguliert. Da Hsp70 essentiell für Transportvorgänge an Membranen ist, ist es wahrscheinlich, dass Hsp70 zusammen mit BAG-Proteinen regulatorische Funktionen bei der Initiierung von Apoptose nicht nur im Zytoplasma, sondern auch auf der Plasmamembran wahrnimmt. Unterstützt wird diese Hypothese durch experimentelle Befunde, die zeigen, dass Hsp70 und Bag-4 in sogenannten Caveolae auf Tumorzellen vorkommen. Caveolae sind Cholesterol- und Sphingolipid-reiche Microdomänen in der äußeren Zellmembran, die als essentiell für exocytotische und endocytotische Vorgänge an der Zellmembran angesehen werden (Anderson und Jacobson, 2002; Fielding und Fielding, 2003). Zusätzlich konnte von mir in den isolierten Caveolae die GTPase Rab-4 detektiert werden. Rab-4 fungiert als Marker für Recycling-Prozesse von vesikulären Strukturen an der Plasmamembran. Andere GTPasen wie z.B. Rab-7, Rab-9 oder Rab-11, die für verschiedene Transportvorgänge charakteristisch sind (vgl. Tab. 3), konnten nicht gemeinsam mit Hsp70 isoliert werden. Dies läßt die Hypothese zu, dass der Transport von Hsp70/Bag-4 zusammen mit anderen Molekülen an die Zelloberfläche im Rahmen der Organisation von Caveolae erfolgt. Vorläufige Daten aus unserem Labor weisen darauf hin, dass die von mir untersuchten

Zellen (CX+/-, Colo+/-, HeLa neo/Bag-4) Exosomen freisetzen, und dass diese Exosomen Hsp70, Bag-4 und Rab-4 auf der Oberfläche exprimieren.

Andere Mitglieder der BAG-Familie (Bag-1, Bag-3) konnten auf der Plasmamembran nicht detektiert werden. Obwohl in den untersuchten Tumorzelllinien signifikante Unterschiede in Hsp70-Membranexpression vorlagen, blieb die Menge des zytoplasmatischen Hsp70 unverändert. Selbst nach subletaler  $\gamma$ -Bestrahlung konnten im Zytoplasma kein Anstieg der Hsp70-Expression festgestellt werden.

Vergleichbare Resultate konnte ich für die zytoplasmatische Expression von Bag-4 feststellen. Im Gegensatz zum Zytoplasma konnte die Menge an Membran-gebundenem Hsp70 nach  $\gamma$ -Bestrahlung in den Tumorsubzelllinien mit ursprünglich schwacher Hsp70-Membranexpression signifikant gesteigert werden. Interessanterweise war ein Hsp70-positiver Phänotyp mit der Oberflächenexpression von Bag-4 assoziiert. Colokalisierung von Hsp70 und Bag-4 wurde von mir mit Hilfe einer Zweifarben-Durchflusszytometrie und mittels Immunzytochemie gezeigt. Diese Befunde weisen darauf hin, dass Hsp70/Bag-4-Komplexe nicht nur im Zytoplasma, sondern auch auf der Plasmamembran vorkommen. Ich konnte feststellen, dass eine Bag-4 Zelloberflächenexpression vitaler Zellen ausschließlich mit Antikörpern detektiert werden konnte, deren Erkennungsepitope im C-Terminus lokalisiert waren. Bag-4 Antikörper, die mit der ATPase Domäne interagierten zeigten keine positive Reaktionen auf. Dies läßt darauf schließen, dass der N-Terminus möglicherweise nicht extrazellulär lokalisiert ist oder für den Antikörper nicht zugänglich ist. Weiterhin geben meine Daten eine mögliche Erklärung dafür, dass Antikörper gegen die ATPase-Domäne von Hsp70 Membran-gebundenes Hsp70 nicht detektieren. Durch Bindung von Bag-4 an die ATPase-Domäne von Hsp70 könnte die ATPase-Domäne sterisch behindert sein. Über Pepscan Analysen des Hsp70 C-Terminus konnte das extrazellulär lokalisierte Peptid TKDNNLLGRFELSG als das Antikörper-Epitop definiert werden. Strukturanalysen der Hsp70-Substratdomäne schließen eine Bindung des Antikörpers an dieser Stellen von Hsp70 nicht aus (siehe Einleitung).

Es wurde beschrieben, dass ein mit Bag-4 assoziiertes Hsp70 an die *death domain* von Tumornekrosefaktorrezeptor 1 (TNFR1) oder Death receptor 3 (DR3) bindet und so die Selbstaggregation zu funktionellen Trimeren verhindert. Deshalb nahm ich an, dass Membran-gebundene Hsp70/Bag-4-Komplexe bei den von mir untersuchten Tumorzellen

auch an die zytoplasmatische Domäne von TNFR1 gebunden vorliegen. Nachdem jedoch weder CX+/CX- noch Colo+/Colo- Karzinomsubzelllinien eine TNFR1 oder DR3 Membranexpression aufweisen, muss diese Hypothese in Frage gestellt werden. Weiterhin konnte eine Inkubation mit TNF $\alpha$  alleine oder zusammen mit Cycloheximid eine TNFR1 vermittelte Apoptose nicht induzieren. Bei Betrachtung dieser Ergebnisse kann man über eine TNFR1/DR3-unabhängigen Translokation von Hsp70/Bag-4 an die Zelloberfläche spekulieren.

#### **5.4 Duale Funktion von Membran-gebundenem Hsp70/Bag-4**

Neben seiner Funktion in apoptotischen Signalwegen spielt Hsp70 eine entscheidende Funktion in der Zellzykluskontrolle. Behandlung von Tumorzellen mit Hsp70 anti-sense Oligomeren führt zu einer Inhibition der Proliferation und zu einer Apoptose-Initiierung. Es wurde angenommen, dass die Überexpression von Hsp70 den Strahlungs-induzierten Zellzyklusarrest in der G2/M-Phase reduzieren konnte. Hier konnte ich zeigen, dass nicht zytoplasmatische, sondern Membran-gebundene Hsp70/Bag-4-Komplexe zum Schutz gegen bestrahlungsinduzierte Schädigungen beitragen. In ungestressten Zellen war das Wachstum von Hsp70 stark und schwach exprimierenden Tumorzellen vergleichbar. Im Gegensatz dazu waren Hsp70/Bag-4 stark exprimierende Zellen nach  $\gamma$ -Bestrahlung wesentlich resistenter als ihre schwach exprimierenden Gegenspieler.

Das extrazellulär präsentierte Hsp70-Epitop konnte als immunogen für NK-Zellen definiert werden. Die Fähigkeit von Hsp70 und Hsp70-Peptiden eine zelluläre Immunantwort zu induzieren bestätigt die Arbeiten unserer und anderer Arbeitsgruppen. Auf der Oberfläche verschiedener immunregulatorischer Zellen, CD40 auf B Zellen (Becker *et al.*, 2002), CD14 und Toll like Rezeptoren auf Monozyten (Asea *et al.*, 2000), CD91 auf Makrophagen (Basu *et al.*, 2001) und CD94 auf NK-Zellen (Gross *et al.*, 2003a), konnten Rezeptoren identifiziert werden, die eine Interaktion und die Aufnahme von Hsp70 ermöglichen. In unserem System konnte gezeigt werden, dass Tumorsubzelllinien mit starker Hsp70/Bag-4-Membranexpression besser gegen bestrahlungsinduzierte Effekte geschützt sind und auf diese Weise eine erhöhte Strahlenresistenz aufweisen. Auf der anderen Seite stellen diese Zellen aber Zielstrukturen für die Zytolyse durch Hsp70-Peptid aktivierte NK-Zellen dar. Der Kontakt von NK-Zellen mit einem extrazellulär lokalisierten

Epitop stimuliert die Synthese und die Sekretion von Granzyme B, einem Apoptose-induzierenden Enzym (Gross *et al.*, 2003b). Membran-gebundenes Hsp70 erleichtert die Aufnahme von Granzyme B in Tumorzellen und induziert so Apoptose in der Tumorzelle. Blockierungsversuche haben bestätigt, dass das auf Tumorzellen präsentierte Epitop in der Tat als Erkennungsstruktur für Hsp70-Peptid aktivierte NK-Zellen dient. Ich konnte zeigen, dass Hsp70 mit Bag-4 auf der Oberfläche von Tumorzellen colokalisiert vorkommt. Es ist deshalb anzunehmen, dass beide Moleküle an der Erkennung durch NK-Zellen beteiligt sind. Obwohl verschiedene Antikörper Bag-4 auf der Zelloberfläche von Tumorzellen detektieren, zeigte keiner eine Blockierung der Lyse von NK-Zellen. Da nur wenige Antikörper zur Inhibierung der Zytolyse befähigt sind, kann die Rolle von Bag-4 als Erkennungsstelle für NK-Zellen nicht vollständig ausgeschlossen werden.

Ich konnte weiterhin zeigen, dass Hsp70/Bag-4 Tumorzellen vor bestrahlungsinduzierten Effekten schützt. Aus diesem Grund könnte eine Hsp70/Bag-4 Membranexpression möglicherweise zukünftig als prognostischer Marker zur Erkennung Therapie-resistenter Tumorzellklone fungieren. Zusätzlich ergaben sich Hinweise darauf, dass Hsp70/Bag-4 als Erkennungsstruktur für NK-Zellen agiert. Deshalb ist anzunehmen, dass  $\gamma$ -Strahlen resistente Tumore mit erhöhter Hsp70/Bag-4 Membranexpression von Hsp70-Peptid aktivierten NK-Zellen eliminiert werden könnten. Die Ergebnisse meiner Arbeit könnten somit die Basis für die Entwicklung einer auf NK-Zellen basierenden Tumorthherapie bilden.

## **5.5 Zusammenfassung und Ausblick**

Erst seit kurzer Zeit ist bekannt, dass das Hitzeschockprotein 70 (Hsp70) auf der Zelloberfläche von Tumorzellen exprimiert wird. Ich konnte in meiner Doktorarbeit zeigen, dass die Oberflächenexpression von Hsp70 nicht nur auf Tumorzellenkulturzelllinien beschränkt ist, sondern auch auf Tumorbiopsiematerial und bei hämatologischen Erkrankungen auftritt. Exemplarisch wurden Daten des Screeningprogramms mit Melanomen gezeigt. Auf Zellen von gesunden Geweben oder auf PBL gesunder Spender konnte keine Hsp70-Oberflächenexpression detektiert werden. Diese Befunde lassen die Aussage zu, dass es sich bei der Hsp70-Membranexpression um ein Tumor-spezifisches Merkmal handelt. Weiterhin untersuchte ich, ob sich die Hsp70-Membranexpression durch anti-neoplastische Reagenzien oder durch eine subletale  $\gamma$ -Bestrahlung modifizieren läßt. Ich konnte feststellen, dass speziell Tubulin-interagierende Zytostatika wie z.B. Paclitaxel oder Vincristin die Hsp70-Expression sowohl im Zytoplasma als auch auf der Membran steigern können. Im Gegensatz dazu wurde die Hsp70-Expression durch DNA-interagierende Reagenzien (z.B. Ifosfamid oder Cytarabin) weder im Zytoplasma noch auf der Zellmembran beeinflusst.

Weiterhin konnte ich feststellen, dass durch subletale  $\gamma$ -Bestrahlung die Hsp70-Membranexpression in Tumorzellen gesteigert werden konnte, die initial eine schwache Expression aufwiesen, wohingegen die Expression von initial stark exprimierenden Zellen nicht beeinflusst wird. Darüber hinaus konnte ich zeigen, dass Hsp70 zusammen mit dem Regulator- und Adapter-Protein Bag-4, sowohl im Zytoplasma, wie auch auf der Zellmembran interagiert. Die Zellmembranexpression von Hsp70 und Bag-4 erscheint nach Stresseinwirkung (Bestrahlung) einer Koregulation zu unterliegen. Erste experimentelle Hinweise meiner Arbeit deuten darauf hin, dass Hsp70 und Bag-4 in der Zellmembran in Caveolae organisiert sind. Eine Koexpression der Proteine mit Caveolin-1 und Rab-4 konnte von mir nachgewiesen werden.

Darüber hinaus gelang es mir nachzuweisen, dass Hsp70/Bag-4-positive Tumorzellen resistenter gegenüber Bestrahlungs-induzierte Effekte sind, wie z.B. dem G2/M-Arrest, der zu einer Proliferationshemmung führt. Zum anderen werden diese gegen konventionelle Therapien resistenten Tumore sehr gut von NK-Zellen erkannt, da Membran-ständiges Hsp70 als Erkennungs- und Zielstruktur fungiert.

## 6 Anhang

### 6.1 *Anmerkungen zu den Strukturmodellen der Hsp70-Substratbindedomäne*

Die zugrundeliegenden Modelle der Substratbindedomänen von Hsp70 sind auf der Website von Expasy öffentlich zugänglich und von mir mit dem frei zugänglichen Programm DeepView/Swiss-PdbViewer bearbeitet worden. Die Vorlage 1dkzA.pdb stammt von einer Röntgenstrukturanalyse mit 2,00 Å Auflösung, die Vorlage 1ckrA.pdb aus einer NMR. Die Sequenz von Hsp70 ist auf der SwissProt Datenbank über die Zugriffsnummer P08107 zugänglich.

Die Websites sind:      Expasy:            <http://www.expasy.org>  
                                 SwissModel:      <http://swissmodel.expasy.org/repository>  
                                 DeepView/  
                                 Swiss-PdbViewer: <http://www.expasy.org/spdbv>



## **6.2 Danksagung**

Besonderer Dank gilt der Leiterin der Arbeitsgruppe für Molekulare Onkologie, Prof. Gabriele Multhoff als Betreuerin meiner Arbeit, ohne deren Engagement und Ansporn diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Ich bedanke mich bei Prof. Holler, der diese Arbeit freundlicherweise an der biologischen Fakultät der Universität Regensburg vertritt, sowie bei Prof. Andreesen, in dessen Abteilung für Hämatologie und Internistische Onkologie ich meine Arbeit durchgeführt habe.

Dank gilt auch meinen jetzigen und ehemaligen Kollegen in der Arbeitsgruppe für Molekulare Onkologie Claus Botzler, Marion Brunner, Robert Gastpar, Catharina Gross, Ulrich Gürtler, Michael Hafner, Daniel Hansch, Markus Hantschel, Lydia Roßmann, Stefan Stangl, Gerald Thonigs, Andreas Worthmann und Tanja Zilch, mit denen ich sehr gerne zusammenarbeite und die mich in allen Angelegenheiten unterstützen.

Den weiteren Kollegen aus dem Carreras-Forschungsbau Karin Fischer, Monika Laumer, Jana Heymann, Sandra Vogl, Clemens Beyer und Christian Greiml danke ich für die freundliche Zusammenarbeit, das gute Arbeitsklima und so manche materielle Gabe.

Dank gilt auch den anderen Kollegen in der Häma/Onko, die mir mit Rat und Tat und Material geholfen haben. Alles und alle aufzuzählen würde den Rahmen sprengen!

Weiterhin bedanke ich mich bei den Abteilungen der Universitätsklinik Regensburg für die Zusammenarbeit und die Probenaquirierung; das sind Chirurgie, Notaufnahme, Pathologie, Klinische Chemie, Dermatologie und Strahlentherapie.

Dank gilt auch dem Krankenhaus der Barmherziger Brüder in Regensburg, dem Klinikum Großhadern in München, der Klinik in Fulda, der Uni-Klinik Weimar, dem Krankenhaus Kronach und der Lungenklinik Hemer, die mit uns zusammenarbeiten und mit Patientenproben unterstützen. Besonderer Dank gilt der Hautklinik des Universitätskrankenhauses in Pécs (Ungarn) und ihrer Leiterin Prof. Beatrix Farcas, mit der zusammen wir Melanome untersucht haben, und deren Arbeit mit uns wohl noch reiche Früchte tragen wird.

Bedanken möchte ich mich auch bei Fr. Dr. Eichholtz-Wirth, die uns die mit Bag-4-transfizierten HeLa-Zellen zur Verfügung gestellt hat.

Schließlich gilt besonderer Dank den Krebspatienten, die trotz aller Sorgen und Unannehmlichkeiten zur Probenentnahme bereit waren, so dass wir Biopsiematerial und Blutproben untersuchen konnten. Gleiches gilt für die Patienten, die an unserer Studie beteiligt waren.

Zwar ganz zum Schluß, aber für mich wichtigsten, möchte ich mich bei meiner Frau Thea, meinen Kindern Alina und Jan, sowie meinen Eltern bedanken, die mich auf dem langen Weg begleitet haben, viele Entbehrungen auf sich genommen haben und mich immer wieder angespornt haben. Ohne die Unterstützung meiner Familie wäre diese Arbeit nicht zustandegekommen!

### **6.3 Erklärung**

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe des Literaturzitats gekennzeichnet.

Weitere Personen waren an der inhaltlich-materiellen Herstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich hierfür nicht die entgeltliche Hilfe eines Promotionsberaters oder anderer Personen in Anspruch genommen. Niemand hat von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Regensburg, den \_\_\_\_\_  
Mathias Gehrman, Dipl. Biol.

## 6.4 Literaturverzeichnis

1. Ait-Aissa, S., J.Porcher, A.Arrigo, and C.Lambre. 2000. Activation of the hsp70 promoter by environmental inorganic and organic chemicals: relationships with cytotoxicity and lipophilicity. *Toxicology* **145**:147-157.
2. Altmeyer, A., R.G.Maki, A.M.Feldweg, M.Heike, V.P.Protopopov, S.K.Masur, and P.K.Srivastava. 1996. Tumor-specific cell surface expression of the-KDEL containing, endoplasmic reticular heat shock protein gp96. *Int. J. Cancer* **69**:340-349.
3. Anderson, R.G. and K.Jacobson. 2002. A role for lipid shells in targeting proteins to caveolae, rafts, and other lipid domains. *Science* **296**:1821-1825.
4. Antoku, K., R.S.Maser, W.J.Scully, Jr., S.M.Delach, and D.E.Johnson. 2001. Isolation of Bcl-2 binding proteins that exhibit homology with BAG-1 and suppressor of death domains protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **286**:1003-1010.
5. Asea, A., S.K.Kraeft, E.A.Kurt-Jones, M.A.Stevenson, L.B.Chen, R.W.Finberg, G.C.Koo, and S.K.Calderwood. 2000. HSP70 stimulates cytokine production through a CD14-dependant pathway, demonstrating its dual role as a chaperone and cytokine. *Nat. Med.* **6**:435-442.

6. Asea, A., M.Rehli, E.Kabingu, J.A.Boch, O.Bare, P.E.Auron, M.A.Stevenson, and S.K.Calderwood. 2002. Novel signal transduction pathway utilized by extracellular HSP70: Role of TLR2 and TLR4. *J. Biol. Chem.*
7. Bardelli, A., P.Longati, D.Albero, S.Goruppi, C.Schneider, C.Ponzetto, and P.M.Comoglio. 1996. HGF receptor associates with the anti-apoptotic protein BAG-1 and prevents cell death. *EMBO J.* **15**:6205-6212.
8. Barral, A.M., A.Fernandez, M.E.Faxas, X.Perez, C.A.Garcia, and A.Rosen. 1997. Cell-cell adherence as a selection method for the generation of anti-melanoma monoclonal antibodies. *J. Immunol. Methods* **203**:103-109.
9. Bartelink, H., J.H.Schellens, and M.Verheij. 2002. The combined use of radiotherapy and chemotherapy in the treatment of solid tumours. *Eur. J. Cancer* **38**:216-222.
10. Basu, S., R.J.Binder, T.Ramalingam, and P.K.Srivastava. 2001. CD91 is a common receptor for heat shock proteins gp96, hsp90, hsp70, and calreticulin. *Immunity.* **14**:303-313.
11. Basu, S., R.J.Binder, R.Suto, K.M.Anderson, and P.K.Srivastava. 2000. Necrotic but not apoptotic cell death releases heat shock proteins, which deliver a partial maturation signal to dendritic cells and activate the NF-kappa B pathway. *Int. Immunol.* **12**:1539-1546.

12. Becker, T., F.U.Hartl, and F.Wieland. 2002. CD40, an extracellular receptor for binding and uptake of Hsp70-peptide complexes. *J. Cell Biol.* **158**:1277-1285.
13. Bhawan, J. 1997. Mel-5: a novel antibody for differential diagnosis of epidermal pigmented lesions of the skin in paraffin-embedded sections. *Melanoma Res.* **7**:43-48.
14. Binder, R.J., N.E.Blachere, and P.K.Srivastava. 2001. Heat shock protein-chaperoned peptides but not free peptides introduced into the cytosol are presented efficiently by major histocompatibility complex I molecules. *J. Biol. Chem.* **276**:17163-17171.
15. Blachere, N.E., Z.Li, R.Y.Chandawarkar, R.Suto, N.S.Jaikaria, S.Basu, H.Udono, and P.K.Srivastava. 1997. Heat shock protein-peptide complexes, reconstituted in vitro, elicit peptide-specific cytotoxic T lymphocyte response and tumor immunity. *J. Exp. Med.* **186**:1315-1322.
16. Blagosklonny, M.V. and T.Fojo. 1999. Molecular effects of paclitaxel: myths and reality (a critical review). *Int. J. Cancer* **83**:151-156.
17. Boeckmann, B., A.Bairoch, R.Apweiler, M.C.Blatter, A.Estreicher, E.Gasteiger, M.J.Martin, K.Michoud, C.O'Donovan, I.Phan, S.Pilbout, and M.Schneider. 2003. The SWISS-PROT protein knowledgebase and its supplement TrEMBL in 2003. *Nucleic Acids Res.* **31**:365-370.

18. Botzler, C., J.Ellwart, W.Gunther, G.Eissner, and G.Multhoff. 1999. Synergistic effects of heat and ET-18-OCH<sub>3</sub> on membrane expression of hsp70 and lysis of leukemic K562 cells. *Exp. Hematol.* **27**:470-478.
19. Botzler, C., R.Issels, and G.Multhoff. 1996. Heat-shock protein 72 cell-surface expression on human lung carcinoma cells is associated with an increased sensitivity to lysis mediated by adherent natural killer cells. *Cancer Immunol. Immunother.* **43**:226-230.
20. Botzler, C., K.Kis, R.Issels, and G.Multhoff. 1997. A comparison of the effects of ifosfamide vs. mafosfamide treatment on intracellular glutathione levels and immunological functions of immunocompetent lymphocyte subsets. *Exp. Hematol.* **25**:338-344.
21. Botzler, C., G.Li, R.D.Issels, and G.Multhoff. 1998. Definition of extracellular localized epitopes of Hsp70 involved in an NK immune response. *Cell Stress. Chaperones.* **3**:6-11.
22. Briknarova, K., S.Takayama, L.Brive, M.L.Havert, D.A.Knee, J.Velasco, S.Homma, E.Cabezas, J.Stuart, D.W.Hoyt, A.C.Satterthwait, M.Llinas, J.C.Reed, and K.R.Ely. 2001. Structural analysis of BAG1 cochaperone and its interactions with Hsc70 heat shock protein. *Nat. Struct. Biol.* **8**:349-352.
23. Castellino, F., P.E.Boucher, K.Eichelberg, M.Mayhew, J.E.Rothman, A.N.Houghton, and R.N.Germain. 2000. Receptor-mediated uptake of antigen/heat

- shock protein complexes results in major histocompatibility complex class I antigen presentation via two distinct processing pathways. *J. Exp. Med.* **191**:1957-1964.
24. Csermely, P. 2001. A nonconventional role of molecular chaperones: involvement in the cytoarchitecture. *News Physiol Sci.* **16**:123-126.
25. de Beer, E.L., A.E.Bottone, and E.E.Voest. 2001. Doxorubicin and mechanical performance of cardiac trabeculae after acute and chronic treatment: a review. *Eur. J. Pharmacol.* **415**:1-11.
26. Doong, H., J.Price, Y.S.Kim, C.Gasbarre, J.Probst, L.A.Liotta, J.Blanchette, K.Rizzo, and E.Kohn. 2000. CAIR-1/BAG-3 forms an EGF-regulated ternary complex with phospholipase C-gamma and Hsp70/Hsc70. *Oncogene* **19**:4385-4395.
27. Eisenhauer, E.A. and J.B.Vermorken. 1998. The taxoids. Comparative clinical pharmacology and therapeutic potential. *Drugs* **55**:5-30.
28. Farkas, B., M.Hantschel, M.Magyarlaki, B.Becker, K.Scherer, M.Landthaler, K.Pfister, M.Gehrmann, C.Gross, A.Mackensen, and G.Multhoff. 2003. Heat shock protein 70 membrane expression and melanoma-associated marker phenotype in primary and metastatic melanoma. *Melanoma Res.* **13**:147-152.
29. Feige, U. and B.S.Polla. 1994. Hsp70--a multi-gene, multi-structure, multi-function family with potential clinical applications. *Experientia* **50**:979-986.



30. Ferrarini, M., S.Heltai, M.R.Zocchi, and C.Rugarli. 1992. Unusual expression and localization of heat-shock proteins in human tumor cells. *Int. J. Cancer* **51**:613-619.
31. Fielding, C.J. and P.E.Fielding. 2003. Relationship between cholesterol trafficking and signaling in rafts and caveolae. *Biochim. Biophys. Acta* **1610**:219-228.
32. Frydman, J. and J.Hohfeld. 1997. Chaperones get in touch: the Hip-Hop connection. *Trends Biochem. Sci.* **22**:87-92.
33. Gabai, V.L., A.B.Meriin, J.A.Yaglom, V.Z.Volloch, and M.Y.Sherman. 1998. Role of Hsp70 in regulation of stress-kinase JNK: implications in apoptosis and aging. *FEBS Lett.* **438**:1-4.
34. Gasteiger, E., E.Jung, and A.Bairoch. 2001. SWISS-PROT: connecting biomolecular knowledge via a protein database. *Curr. Issues Mol. Biol.* **3**:47-55.
35. Gehrman,M., J.Marienhagen, H.Eichholtz-Wirth, E.Fritz, J.Ellwart, M.Jaattela, T.Zilch, and G.Multhoff. 2003a. Membrane-bound heat shock protein 70 (Hsp70) associated with Bag-4 Confers resistance to irradiation and provides a target for Natural killer (NK) cells. *Biol. Chem.* (Submitted)
36. Gehrman, M., K.Pfister, P.Hutzler, R.Gastpar, B.Margulis, and G.Multhoff. 2002. Effects of antineoplastic agents on cytoplasmic and membrane-bound heat shock protein 70 (Hsp70) levels. *Biol. Chem.* **383**:1715-1725.

37. Gehrmann, M., H.Schmetzer, G.Eissner, T.Haferlach, W.Hiddemann, and G.Multhoff. 2003b. Membrane-bound heat shock protein 70 (Hsp70) in acute myeloid leukemia: a tumor specific recognition structure for the cytolytic activity of autologous NK cells. *Haematologica* **88**:474-476.
38. Gidding, C.E., S.J.Kellie, W.A.Kamps, and S.S.de Graaf. 1999. Vincristine revisited. *Crit Rev. Oncol. Hematol.* **29**:267-287.
39. Grant, S. 1998. Ara-C: cellular and molecular pharmacology. *Adv. Cancer Res.* **72**:197-233.
40. Gross, C., D.Hansch, R.Gastpar, and G.Multhoff. 2003a. Interaction of heat shock protein 70 peptide with NK cells involves the NK receptor CD94. *Biol. Chem.* **384**:267-279.
41. Gross, C., W.Koelch, A.DeMaio, N.Arispe, and G.Multhoff. 2003b. Cell surface-bound heat shock protein 70 (Hsp70) mediates perforin-independent apoptosis by specific binding and uptake of granzyme B. *J. Biol. Chem.* (in press)
42. Gunther, E. and L.Walter. 1994. Genetic aspects of the hsp70 multigene family in vertebrates. *Experientia* **50**:987-1001.
43. Haas,I.G. 1994. BiP (GRP78), an essential hsp70 resident protein in the endoplasmic reticulum. *Experientia* **50**, 1012-1020.

44. Hantschel, M., K.Pfister, A.Jordan, R.Scholz, R.Andreesen, G.Schmitz, H.Schmetzer, W.Hiddemann, and G.Multhoff. 2000. Hsp70 plasma membrane expression on primary tumor biopsy material and bone marrow of leukemic patients. *Cell Stress. Chaperones*. **5**:438-442.
45. Hartl, F.U. and M.Hayer-Hartl. 2002. Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. *Science* **295**:1852-1858.
46. Helmbrecht, K., E.Zeise, and L.Rensing. 2000. Chaperones in cell cycle regulation and mitogenic signal transduction: a review. *Cell Prolif.* **33**:341-365.
47. Hennequin, C. and V.Favaudon. 2002. Biological basis for chemo-radiotherapy interactions. *Eur. J. Cancer* **38**:223-230.
48. Hohfeld, J., D.M.Cyr, and C.Patterson. 2001. From the cradle to the grave: molecular chaperones that may choose between folding and degradation. *EMBO Rep.* **2**:885-890.
49. Hohfeld, J. and S.Jentsch. 1997. GrpE-like regulation of the hsc70 chaperone by the anti-apoptotic protein BAG-1. *EMBO J.* **16**:6209-6216.
50. Hohfeld, J., Y.Minami, and F.U.Hartl. 1995. Hip, a novel cochaperone involved in the eukaryotic Hsc70/Hsp40 reaction cycle. *Cell* **83**:589-598.

- 
51. Ishii, T., H.Udono, T.Yamano, H.Ohta, A.Uenaka, T.Ono, A.Hizuta, N.Tanaka, P.K.Srivastava, and E.Nakayama. 1999. Isolation of MHC class I-restricted tumor antigen peptide and its precursors associated with heat shock proteins hsp70, hsp90, and gp96. *J. Immunol.* **162**:1303-1309.
  52. Jaattela, M. 1999. Escaping cell death: survival proteins in cancer. *Exp. Cell Res.* **248**:30-43.
  53. Jaattela, M., D.Wissing, K.Kokholm, T.Kallunki, and M.Egeblad. 1998. Hsp70 exerts its anti-apoptotic function downstream of caspase-3-like proteases. *EMBO J.* **17**:6124-6134.
  54. Jiang, Y., J.D.Woronicz, W.Liu, and D.V.Goeddel. 1999. Prevention of constitutive TNF receptor 1 signaling by silencer of death domains. *Science* **283**:543-546.
  55. Johnson, S.A. 2000. Clinical pharmacokinetics of nucleoside analogues: focus on haematological malignancies. *Clin. Pharmacokinet.* **39**:5-26.
  56. Jolly, C., L.Konecny, D.L.Grady, Y.A.Kutskova, J.J.Cotto, R.I.Morimoto, and C.Vourc'h. 2002. In vivo binding of active heat shock transcription factor 1 to human chromosome 9 heterochromatin during stress. *J. Cell Biol.* **156**:775-781.
  57. Kanelakis, K.C., Y.Morishima, K.D.Dittmar, M.D.Galigniana, S.Takayama, J.C.Reed, and W.B.Pratt. 1999. Differential effects of the hsp70-binding protein

- BAG-1 on glucocorticoid receptor folding by the hsp90-based chaperone machinery. *J. Biol. Chem.* **274**:34134-34140.
58. Kiang, J.G. and G.C.Tsokos. 1998. Heat shock protein 70 kDa: molecular biology, biochemistry, and physiology. *Pharmacol. Ther.* **80**:183-201.
59. Kingston, D.G. 2000. Recent advances in the chemistry of taxol. *J. Nat. Prod.* **63**:726-734.
60. Krause, S.W., R.Gastpar, R.Andreesen, C.Gross, H.Ullrich, G.Thonigs, K.Pfister, and G.Multhoff. 2003. Treatment of Colon and Lung Cancer Patients with ex vivo Hsp70-Peptide Activated, Autologous Natural Killer (NK) Cells: a Clinical Phase I Trial. *Clin. Cancer Res.* (Submitted)
61. Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**:680-685.
62. Laird, P.W., A.Zijderveld, K.Linders, M.A.Rudnicki, R.Jaenisch, and A.Berns. 1991. Simplified mammalian DNA isolation procedure. *Nucleic Acids Res.* **19**:4293.
63. Lee, S.J., S.A.Choi, K.H.Lee, H.Y.Chung, T.H.Kim, C.K.Cho, and Y.S.Lee. 2001. Role of inducible heat shock protein 70 in radiation-induced cell death. *Cell Stress. Chaperones.* **6**:273-281.

- 
64. Liu, R., S.Takayama, Y.Zheng, B.Froesch, G.Q.Chen, X.Zhang, J.C.Reed, and X.K.Zhang. 1998. Interaction of BAG-1 with retinoic acid receptor and its inhibition of retinoic acid-induced apoptosis in cancer cells. *J. Biol. Chem.* **273**:16985-16992.
65. Lozzio, C.B. and B.B.Loizzio. 1975. Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive Philadelphia chromosome. *Blood* **45**:321-334.
66. Luders, J., J.Demand, S.Schonfelder, M.Frien, R.Zimmermann, and J.Hohfeld. 1998. Cofactor-induced modulation of the functional specificity of the molecular chaperone Hsc70. *Biol. Chem.* **379**:1217-1226.
67. MacDonald, H.R., H.D.Engers, J.C.Cerottini, and K.T.Brunner. 1974. Generation of cytotoxic T lymphocytes in vitro. II. Effect of repeated exposure to alloantigens on the cytotoxic activity of long-term mixed leukocyte cultures. *J. Exp. Med.* **140**:718-730.
68. Mathew, A., S.K.Mathur, C.Jolly, S.G.Fox, S.Kim, and R.I.Morimoto. 2001. Stress-specific activation and repression of heat shock factors 1 and 2. *Mol. Cell Biol.* **21**:7163-7171.
69. Mathew, A., S.K.Mathur, and R.I.Morimoto. 1998. Heat shock response and protein degradation: regulation of HSF2 by the ubiquitin-proteasome pathway. *Mol. Cell Biol.* **18**:5091-5098.

70. Meacham, G.C., C.Patterson, W.Zhang, J.M.Younger, and D.M.Cyr. 2001. The Hsc70 co-chaperone CHIP targets immature CFTR for proteasomal degradation. *Nat. Cell Biol.* **3**:100-105.
71. Miki, K. and E.M.Eddy. 2002. Tumor necrosis factor receptor 1 is an ATPase regulated by silencer of death domain. *Mol. Cell Biol.* **22**:2536-2543.
72. Minami, Y., J.Hohfeld, K.Ohtsuka, and F.U.Hartl. 1996. Regulation of the heat-shock protein 70 reaction cycle by the mammalian DnaJ homolog, Hsp40. *J. Biol. Chem.* **271**:19617-19624.
73. Morgan, R.T., L.K.Woods, G.E.Moore, L.A.Quinn, L.McGavran, and S.G.Gordon. 1980. Human cell line (COLO 357) of metastatic pancreatic adenocarcinoma. *Int. J. Cancer* **25**:591-598.
74. Morimoto, R.I. 1998. Regulation of the heat shock transcriptional response: cross talk between a family of heat shock factors, molecular chaperones, and negative regulators. *Genes Dev.* **12**:3788-3796.
75. Moser, C., C.Schmidbauer, U.Gurtler, C.Gross, M.Gehrmann, G.Thonigs, K.Pfister, and G.Multhoff. 2002. Inhibition of tumor growth in mice with severe combined immunodeficiency is mediated by heat shock protein 70 (Hsp70)-peptide-activated, CD94 positive natural killer cells. *Cell Stress. Chaperones.* **7**:365-373.

- 
76. Multhoff, G., C.Botzler, A.Allenbacher, and R.Issels. 1996. Effects of ifosfamide on immunocompetent effector cells. *Cancer Immunol. Immunother.* **42**:251-254.
77. Multhoff, G., C.Botzler, L.Jennen, J.Schmidt, J.Ellwart, and R.Issels. 1997. Heat shock protein 72 on tumor cells: a recognition structure for natural killer cells. *J. Immunol.* **158**:4341-4350.
78. Multhoff, G., C.Botzler, M.Wiesnet, G.Eissner, and R.Issels. 1995a. CD3- large granular lymphocytes recognize a heat-inducible immunogenic determinant associated with the 72-kD heat shock protein on human sarcoma cells. *Blood* **86**:1374-1382.
79. Multhoff, G., C.Botzler, M.Wiesnet, E.Muller, T.Meier, W.Wilmanns, and R.D.Issels. 1995b. A stress-inducible 72-kDa heat-shock protein (HSP72) is expressed on the surface of human tumor cells, but not on normal cells. *Int. J. Cancer* **61**:272-279.
80. Multhoff, G., L.Mizzen, C.C.Winchester, C.M.Milner, S.Wenk, G.Eissner, H.H.Kampinga, B.Laumbacher, and J.Johnson. 1999. Heat shock protein 70 (Hsp70) stimulates proliferation and cytolytic activity of natural killer cells. *Exp. Hematol.* **27**:1627-1636.
81. Multhoff, G., K.Pfister, M.Gehrmann, M.Hantschel, C.Gross, M.Hafner, and W.Hiddemann. 2001. A 14-mer Hsp70 peptide stimulates natural killer (NK) cell activity. *Cell Stress. Chaperones.* **6**:337-344.



- 
82. Nollen, E.A. and R.I. Morimoto. 2002. Chaperoning signaling pathways: molecular chaperones as stress-sensing 'heat shock' proteins. *J. Cell Sci.* **115**[Pt 14], 2809-2816.
83. O'Dwyer, P.J., J.P. Stevenson, and S.W. Johnson. 2000. Clinical pharmacokinetics and administration of established platinum drugs. *Drugs* **59 Suppl 4**:19-27.
84. Parsell, D.A., A.S. Kowal, M.A. Singer, and S. Lindquist. 1994. Protein disaggregation mediated by heat-shock protein Hsp104. *Nature* **372**:475-478.
85. Pereira-Leal, J.B. and M.C. Seabra. 2001. Evolution of the Rab family of small GTP-binding proteins. *J. Mol. Biol.* **313**:889-901.
86. Pfeiffer, A., A. Bottcher, E. Orso, M. Kapinsky, P. Nagy, A. Bodnar, I. Spreitzer, G. Liebisch, W. Drobnik, K. Gempel, M. Horn, S. Holmer, T. Hartung, G. Multhoff, G. Schutz, H. Schindler, A.J. Ulmer, H. Heine, F. Stelter, C. Schutt, G. Rothe, J. Szollosi, S. Damjanovich, and G. Schmitz. 2001. Lipopolysaccharide and ceramide docking to CD14 provokes ligand-specific receptor clustering in rafts. *Eur. J. Immunol.* **31**:3153-3164.
87. Ravagnan, L., S. Gurbuxani, S.A. Susin, C. Maise, E. Daugas, N. Zamzami, T. Mak, M. Jaattela, J.M. Penninger, C. Garrido, and G. Kroemer. 2001. Heat-shock protein 70 antagonizes apoptosis-inducing factor. *Nat. Cell Biol.* **3**:839-843.

- 
88. Ritossa, F.M. 1962. A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in *Drosophila*. *Experientia* **18**, 571-573.
89. Ritossa, F. 1996. Discovery of the heat shock response. *Cell Stress. Chaperones*. **1**:97-98.
90. Roigas, J., E.S.Wallen, S.A.Loening, and P.L.Moseley. 1998. Effects of combined treatment of chemotherapeutics and hyperthermia on survival and the regulation of heat shock proteins in Dunning R3327 prostate carcinoma cells. *Prostate* **34**:195-202.
91. Satyal, S.H., D.Chen, S.G.Fox, J.M.Kramer, and R.I.Morimoto. 1998. Negative regulation of the heat shock transcriptional response by HSBP1. *Genes Dev*. **12**:1962-1974.
92. Scherer, W.F., J.T.Syverton, and G.O.Gey. 1953. Studies on the propagation in vitro of poliomyelitis viruses. IV. Viral multiplication in a stable strain of human malignant epithelial cells (strain HeLa) derived from an epidermoid carcinoma of the cervix. *J. Exp. Med.* **97**:695-710.
93. Schwede, T., J.Kopp, N.Guex, and M.C.Peitsch. 2003. SWISS-MODEL: An automated protein homology-modeling server. *Nucleic Acids Res.* **31**:3381-3385.
94. Seabra, M.C., E.H.Mules, and A.N.Hume. 2002. Rab GTPases, intracellular traffic and disease. *Trends Mol. Med.* **8**:23-30.

- 
95. Segev, N. 2001. Ypt and Rab GTPases: insight into functions through novel interactions. *Curr. Opin. Cell Biol.* **13**:500-511.
  96. Shi, Y., D.D.Mosser, and R.I.Morimoto. 1998. Molecular chaperones as HSF1-specific transcriptional repressors. *Genes Dev.* **12**:654-666.
  97. Shin, B.K., H.Wang, A.M.Yim, F.Le Naour, F.Brichory, J.H.Jang, R.Zhao, E.Puravs, J.Tra, C.W.Michael, D.E.Misek, and S.M.Hanash. 2003. Global profiling of the cell surface proteome of cancer cells uncovers an abundance of proteins with chaperone function. *J. Biol. Chem.* **278**:7607-7616.
  98. Sierra-Rivera, E., G.J.Voorhees, and M.L.Freeman. 1993. Gamma irradiation increases hsp-70 in Chinese hamster ovary cells. *Radiat. Res.* **135**:40-45.
  99. Smart, E.J., Y.S.Ying, P.A.Conrad, and R.G.Anderson. 1994. Caveolin moves from caveolae to the Golgi apparatus in response to cholesterol oxidation. *J. Cell Biol.* **127**:1185-1197.
  100. Snyder, J.P., J.H.Nettles, B.Cornett, K.H.Downing, and E.Nogales. 2001. The binding conformation of Taxol in beta-tubulin: a model based on electron crystallographic density. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **98**:5312-5316.
  101. Sonderrmann, H., C.Scheufler, C.Schneider, J.Hohfeld, F.U.Hartl, and I.Moarefi. 2001. Structure of a Bag/Hsc70 complex: convergent functional evolution of Hsp70 nucleotide exchange factors. *Science* **291**:1553-1557.

102. Song, J., M.Takeda, and R.I.Morimoto. 2001. Bag1-Hsp70 mediates a physiological stress signalling pathway that regulates Raf-1/ERK and cell growth. *Nat. Cell Biol.* **3**:276-282.
103. Stone, H.B., C.N.Coleman, M.S.Anscher, and W.H.McBride. 2003. Effects of radiation on normal tissue: consequences and mechanisms. *Lancet Oncol.* **4**:529-536.
104. Stuart, R.A., D.M.Cyr, and W.Neupert. 1994. Hsp70 in mitochondrial biogenesis: from chaperoning nascent polypeptide chains to facilitation of protein degradation. *Experientia* **50**:1002-1011.
105. Suzuki, K. and M.Watanabe. 1992. Augmented expression of HSP72 protein in normal human fibroblasts irradiated with ultraviolet light. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **186**:1257-1264.
106. Takayama, S., D.N.Bimston, S.Matsuzawa, B.C.Freeman, C.Aime-Sempe, Z.Xie, R.I.Morimoto, and J.C.Reed. 1997. BAG-1 modulates the chaperone activity of Hsp70/Hsc70. *EMBO J.* **16**:4887-4896.
107. Takayama, S. and J.C.Reed. 2001. Molecular chaperone targeting and regulation by BAG family proteins. *Nat. Cell Biol.* **3**:237-241.

108. Takayama, S., T.Sato, S.Krajewski, K.Kochel, S.Irie, J.A.Millan, and J.C.Reed. 1995. Cloning and functional analysis of BAG-1: a novel Bcl-2-binding protein with anti-cell death activity. *Cell* **80**:279-284.
109. Takayama, S., Z.Xie, and J.C.Reed. 1999. An evolutionarily conserved family of Hsp70/Hsc70 molecular chaperone regulators. *J. Biol. Chem.* **274**:781-786.
110. Terlecky, S.R. 1994. Hsp70s and lysosomal proteolysis. *Experientia* **50**, 1021-1025.
111. Thress, K., J.Song, R.I.Morimoto, and S.Kornbluth. 2001. Reversible inhibition of Hsp70 chaperone function by Scythe and Reaper. *EMBO J.* **20**:1033-1041.
112. Tissieres, A., H.K.Mitchell, and U.M.Tracy. 1974. Protein synthesis in salivary glands of *Drosophila melanogaster*: relation to chromosome puffs. *J. Mol. Biol.* **84**:389-398.
113. Todryk, S.M., J.Gough, and G.Pockley. 2003. Facets of heat shock protein 70 show immunotherapeutical potential. *Immunology* **110**, 1-9.
114. Towbin, H., T.Staehelin, and J.Gordon. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **76**:4350-4354.
115. Travis, L.B. 2002. Therapy-associated solid tumors. *Acta Oncol.* **41**:323-333.

116. Van Molle, W., B.Wielockx, T.Mahieu, M.Takada, T.Taniguchi, K.Sekikawa, and C.Libert. 2002. HSP70 protects against TNF-induced lethal inflammatory shock. *Immunity*. **16**:685-695.
  
117. Walter, S. and J.Buchner. 2002. Molecular chaperones--cellular machines for protein folding. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* **41**:1098-1113.
  
118. Wei, Y.Q., X.Zhao, Y.Kariya, K.Teshigawara, and A.Uchida. 1995. Inhibition of proliferation and induction of apoptosis by abrogation of heat-shock protein (HSP) 70 expression in tumor cells. *Cancer Immunol. Immunother.* **40**:73-78.
  
119. Weissman, A.M. 1991. Preparation of membranes by dounce homogenization. *In* Current Protocols in Immunology. John Wiley & Sons, Inc., New York, U.S.A. 8.1.2.-8.1.4.
  
120. Zalupski, M. and L.H.Baker. 1988. Ifosfamide. *J. Natl. Cancer Inst.* **80**:556-566.